

*João Miguel Marques dos Santos*

# **Prevenção da Microinfiltração Coronária no Tratamento Endodôntico**

---

Coimbra, 2008





Dissertação de candidatura ao grau de doutor  
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.



**Orientadores:**

Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita  
Faculdade de Medicina - Universidade de Coimbra

Professor Doutor Shimon Friedman  
Faculty of Dentistry - Universidade de Toronto

A elaboração deste trabalho decorreu no Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial, no Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e no Instituto de Tecnologia Biomédica da Estação Zootécnica Nacional – pólo de Santarém.

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação (Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Art.108, § único).



**Aos meus pais,  
Manuel e Fernanda,  
pelos valores transmitidos**



**À Djamila,  
pelo apoio incondicional**





*"Man's mind stretched to a new idea  
never goes back to its original dimension"*

Albert Einstein



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor João Luís Maló de Abreu por nos ter incentivado e apoiado constantemente para progredirmos na carreira académica. A sua determinação na construção de um Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial que se afirme pela excelência da qualidade de ensino e investigação, constitui um apelo que nos motiva e para o qual desejamos continuar a dar o nosso contributo.

Um agradecimento muito especial ao Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita que, mais uma vez, após a orientação da dissertação de Mestrado, nos honrou ao aceitar a supervisão deste trabalho. O nosso reconhecimento pelos conhecimentos científicos transmitidos, pelos conselhos e por toda a disponibilidade e amizade demonstrada ao longo deste percurso.

Ao Professor Doutor Shimon Friedman pelo privilégio que nos concedeu de estagiarmos no seu Departamento e por, posteriormente, nos distinguir com a orientação deste trabalho. Reconhecemos com gratidão o contributo que nos proporcionou para a aquisição de novas competências e saberes, incentivando-nos à reflexão crítica e a uma visão holística da Endodontia.

Ao Professor Doutor Fernando Guerra que, pelo dinamismo e capacidade de trabalho, impulsionou o desenvolvimento de condições técnicas e humanas sem as quais não seria possível a concretização deste trabalho. Manifestamos também o nosso apreço pelos laços de amizade.

À Professora Doutora Teresa Gonçalves pelo apoio científico e pela disponibilização de equipamentos e materiais do Laboratório de Microbiologia da nossa Faculdade.

Ao Professor Doutor Jorge Leitão pelas facilidades concedidas na utilização das instalações do Instituto de Tecnologia Biomédica.

Aos Professores Drs. Carlos Leite da Silva e José Branquinho de Carvalho, pela honestidade profissional e sentido de justiça com que souberam dirigir as áreas disciplinares com que mais colaborámos.

Ao Doutor João Carlos Ramos que nos acompanhou desde os primeiros passos profissionais e com quem temos trilhado dia-a-dia um caminho de procura constante de melhoria da prática clínica e científica.

Ao Dr. Paulo Palma, amigo e colega, pelo sincero interesse com que acompanhou e ajudou na elaboração deste trabalho.

À Sra. Cláudia Brites, pela disponibilidade e auxílio na realização da parte experimental, e pelo profissionalismo e rigor técnico com que executou as preparações histológicas.

À Dr.<sup>a</sup> Alexandra Vinagre e à Eng.<sup>a</sup> Cristina Mourão pelo apoio na concretização de ambas as partes experimentais deste trabalho.

Ao Professor Doutor Ramiro Mascarenhas, ao Dr. João Maria Nobre, à Eng.<sup>a</sup> Isaura Geraldo, ao Dr. Jorge Pimenta e ao Sr. Paulo Dias pelo profissionalismo e dedicação com que nos receberam no Instituto de Tecnologia Biomédica – Estação Zootécnica Nacional – polo de Santarém.

À Professora Doutora Helena Figueiredo, pelo entusiasmo contagiante com que acompanhou a parte de avaliação histopatológica deste trabalho.

Aos Drs. Marques Ferreira, Francisco Sanches, Daniel Gonçalves, Bernardo Albuquerque e Siri Folques Paulo, colegas de Endodontia, pela colaboração e compreensão pela nossa momentânea menor disponibilidade.

Ao Sr. Bruce Finnigan, da empresa Pentron Clinical Technologies, e à Sr.<sup>a</sup> Helga Janda, da empresa Roeko, pela disponibilização de materiais recém-desenvolvidos para serem por nós testados.

Ao Mestre Dr. José Humberto Paiva de Carvalho pelo apoio na preparação do gel de clorhexidina experimental.

Ao Professor Doutor Emanuel Ponciano pela ajuda na determinação da dimensão adequada das amostras e dos grupos do projecto de investigação.

À Professora Doutora Isabel Poiares Baptista e ao Doutor Pedro Nicolau, pela amizade e pelo constante estímulo com que apoiaram este projecto.

Ao Dr. Sérgio Matos, colega de jornada desde os tempos da licenciatura, pela amizade e companheirismo que partilhamos.

Às Sr.<sup>as</sup> Maria José Bera e Maria de Lurdes Mendes pela disponibilização atempada das referências bibliográficas solicitadas.

Aos restantes funcionários do Departamento que sempre estiveram disponíveis para a resolução de questões que surgiram ao longo da preparação desta dissertação.



# Sumário

## I – Introdução

1. Microbiologia da periodontite apical
  - 1.1. Portas de entrada dos microrganismos
  - 1.2. Distribuição dos microrganismos
  - 1.3. Ecologia da população microbiana em infecções primárias
2. Métodos de controlo e erradicação da infecção canalар
  - 2.1. Resposta do hospedeiro
  - 2.2. Antibioterapia sistémica
  - 2.3. Preparação biomecânica
  - 2.4. Medicação intracanalар
  - 2.5. Obturação canalар
  - 2.6. Restauração coronária
3. Periodontite apical pós-tratamento endodóntico
  - 3.1. Etiologia
  - 3.2. Microinfiltração coronária

## II – Trabalho experimental

### A) Estudo experimental *in vitro*

1. Objectivos
2. Materiais e métodos
3. Resultados
4. Discussão

### B) Estudo experimental *in vivo*

1. Objectivos
2. Materiais e métodos
3. Resultados
4. Discussão

### C) Conclusões

## III – Resumo

## IV – Summary

## V – Bibliografia

## VI – Anexos

## VII – Índice

## VIII – Table of contents





## **I – Introdução**

---



## Introdução

A importância dos microrganismos no desenvolvimento da inflamação pulpar e periapical começou a ser reconhecida quando, em 1894, Willoughby Dayton Miller descreveu a presença de bactérias no interior de polpas necrosadas (*cit in* Sjögren 1996). Contudo, apenas passados 70 anos, Kakehashi e colaboradores apresentaram, pela primeira vez, provas conclusivas do papel fundamental das bactérias no desenvolvimento da patologia pulpar. O seu estudo de experimentação animal utilizou 2 grupos de ratos, um com flora oral normal e o outro constituído por animais gnotobióticos ("germ-free"). Realizaram a trepanação da cavidade pulpar, em dentes molares, e deixaram a polpa exposta ao meio oral por um período variável de 1 a 42 dias. No grupo de animais com flora microbiana normal, a reacção inflamatória inicial foi grave, com necrose pulpar ao fim de 8 dias e desenvolvimento de uma resposta inflamatória com infecção dos tecidos periapicais nos períodos subsequentes. Pelo contrário, no grupo de animais gnotobióticos a inflamação pulpar foi ligeira e não se registou qualquer caso de necrose. A agressão foi de tal modo bem tolerada que aos 14 dias era já detectável o começo da formação de pontes dentinárias. Ao fim de 28 dias estas já se encontravam completas, independentemente da gravidade da exposição a que tinha sido submetida a polpa (Kakehashi *et al.* 1965).

Até à década de 70, as pesquisas realizadas para identificar os microrganismos envolvidos na etiologia das lesões pulpares apresentavam resultados bastante variados e imprecisos. Este facto ficou a dever-se, fundamentalmente, à diversidade de técnicas bacteriológicas utilizadas, aos problemas com a contaminação, e às limitações existentes nas técnicas de cultura, sobretudo em

ambiente de anaerobiose. Os estudos microbiológicos deste período indicavam um predomínio das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, relegando para segundo plano as anaeróbias estritas (Brown e Rudolph 1957; Shovelton e Sidaway 1960; Engstrom e Frostell 1961; Seltzer *et al.* 1964). Contudo, o trabalho publicado por Möller, em 1966, permitiu um progresso substancial nesta matéria. Este autor desenvolveu refinados procedimentos de colheita, melhorou os meios de cultura e aprimorou as técnicas de cultura em anaerobiose (Moller 1966). Os estudos subsequentes, que fizeram uso destes conhecimentos, passaram a identificar um maior número de espécies bacterianas, assim como uma maior proporção de anaeróbios.

A otimização das técnicas de isolamento, transporte e cultura de anaeróbios permitiram a Sundqvist, em 1976, publicar uma pesquisa que clarificou a composição e os efeitos da microflora do canal radicular, questionando os conceitos até então vigentes no meio acadêmico. Neste estudo foi avaliada a flora microbiana de 32 canais de dentes humanos, monorradiculares, necrosados após traumatismo e com coroas intactas. Em 19 destes dentes não eram visíveis sinais radiográficos de periodontite periapical e os respectivos canais apresentaram culturas microbianas negativas. Por outro lado, 18 dos 19 dentes com sinais radiográficos de periodontite apical permitiram o isolamento e a cultura de bactérias a partir dos seus canais radiculares. Destes 18 canais foram isoladas um total de 88 espécies bacterianas, das quais apenas 5 espécies eram anaeróbias facultativas, sendo as restantes (94%) anaeróbias estritas. O número de espécies identificadas num único canal variou entre 1 a 12 (Sundqvist 1976). Este estudo abalou o conceito de que os principais patogénios endodônticos eram as bactérias anaeróbias facultativas.

Um estudo posterior, realizado por Möller e colaboradores, em 1981, veio consubstanciar e consolidar a importância dos microrganismos na etiologia das lesões pulpares e periapicais. Nesta investigação foram necrosadas assepticamente as polpas de 78 dentes de macacos sendo depois divididas em dois grupos. Num destes os dentes foram selados e restaurados imediatamente em condições de assepsia. No outro, a câmara pulpar foi deixada exposta à flora oral durante uma semana, tendo sido depois também selados e restaurados. Após 6 a 7 meses, os exames clínico, bacteriológico, histológico e radiográfico dos dentes restaurados assepticamente não mostravam quaisquer sinais de inflamação, crescimento bacteriano nos canais radiculares ou alteração patológica ou radiográfica dos tecidos periapicais. Por outro lado, na maior parte dos dentes expostos à flora autóloga observaram-se sinais de inflamação, crescimento

bacteriano positivo, patologia periapical e espessamento da lâmina dura. Por conseguinte, os autores concluíram que apenas as polpas necrosadas e infectadas têm potencial para induzir patologia dos tecidos periapicais (Moller *et al.* 1981).

Conjuntamente, os dois estudos anteriores permitiram refutar a ideia dominante até aos anos 60, de que a polpa necrosada e os fluidos tecidulares estagnados no canal poderiam por si mesmos causar ou manter a patologia apical (Shovelton e Sidaway 1960). O volume de provas científicas existentes na actualidade é suficiente para afirmarmos que a grande maioria das lesões pulpares e periapicais são da responsabilidade directa ou indirecta dos microrganismos (Moller *et al.* 1981; Fabricius *et al.* 1982b; Nair *et al.* 1990a; Lin *et al.* 1991; Sjögren 1996; Siqueira 2001).

Por conseguinte, hoje em dia o tratamento endododôntico é considerado fundamentalmente como a resolução ou prevenção clínica de um problema microbiológico, no decurso do qual existe uma preocupação constante pela redução da população microbiana ou pela implementação de cuidados de assepsia que permitam a manutenção da não contaminação do sistema de canais. Além disso, pretendemos assegurar que as condições alcançadas após a preparação canalar sejam mantidas a longo prazo. Este último objectivo é conseguido através da obturação tridimensional do canal radicular, bem como por medidas de protecção adicional contra a reentrada de microrganismos no sistema canalar, que serão alvo de estudo na parte experimental deste trabalho.

## **1. Microbiologia da periodontite apical**

### **1.1. Portas de entrada dos microrganismos**

Em condições fisiológicas o tecido pulpar e a dentina circundante estão protegidos das agressões pelo esmalte e cimento. Não obstante, a cárie dentária, a doença periodontal, o trauma, a sua ausência por má formação e a remoção terapêutica ou iatrogénica podem criar soluções de continuidade, colocando a dentina e, eventualmente a polpa, expostas aos efeitos nocivos de irritantes mecânicos, químicos e microbianos (Baumgartner 2002).

Assim, as principais vias de contaminação pulpar são os túbulos dentinários, a polpa exposta, o ligamento periodontal e a anacorese, pelo que passamos a descrevê-las.

A progressão da cárie em direção à polpa expõe os túbulos a bactérias da complexa microflora das cáries profundas, a saber, Gram-positivas anaeróbias obrigatórias. Estas foram observadas, em estudos de microscopia, a progredir no interior de alguns túbulos dentinários, à frente da lesão cariosa (Hoshino *et al.* 1992).

A polpa dentária pode também ser subitamente exposta ao meio oral devido a traumatismos e, por conseguinte, ficar acessível à flora da placa supra-gengival e da saliva, constituída maioritariamente por anaeróbios facultativos, contendo por vezes fungos e bactérias extra-orais (Chu *et al.* 2005).

Na presença de bolsas periodontais, a microflora subgengival fica com diversas portas de entrada disponíveis para chegar à polpa necrosada e encontrar um nicho ecológico favorável ao seu desenvolvimento. Os periodontopatogénos dominantes nas bolsas são sobretudo anaeróbios obrigatórios, bastonetes gram-negativos e espiroquetas, bem como cocos e bastonetes gram-positivos (Kobayashi *et al.* 1990). A partir da placa subgengival, os microrganismos e os produtos do seu metabolismo podem atingir a polpa através dos canais cavo-interradicular, laterais, acessórios, ou mesmo, por fim, pelo *foramen* apical (Socransky 1997). Além disso, a cárie radicular, as falhas na formação do cimento na zona cervical, a reabsorção ou o alisamento radicular podem expor os túbulos dentinários e, por conseguinte, criar uma porta adicional de entrada para a polpa (Adriaens *et al.* 1988). Ainda assim, a possibilidade de bactérias com origem nas bolsas periodontais causarem infecção do canal radicular é um assunto controverso. Nalguns estudos foi possível observar, histologicamente, zonas de inflamação e áreas de necrose localizada no tecido pulpar adjacente a estas portas de entrada (Rubach e Mitchell 1965; Langeland *et al.* 1974). Noutros não foi possível estabelecer uma correlação entre a patologia periodontal e as alterações patológicas do tecido pulpar (Torabinejad e Kiger 1985; Berg *et al.* 1990; Cortellini e Tonetti 2001).

Não obstante, verificou-se que quando a polpa está vital, e com capacidade de defesa, as bactérias são habitualmente impedidas de progredir e o complexo pulpo-dentinário restabelece a sua normalidade (Bergenholtz 1990), ao passo que, quando se encontra necrosada a infecção pode estabelecer-se com muito maior facilidade (Kobayashi *et al.* 1990; Kurihara *et al.* 1995).

Por último, o fenómeno de anacorese é definido como uma atracção dos microrganismos circulantes, durante uma bacteriémia, para áreas de tecidos necrosados ou inflamados, como por exemplo uma pulpíte, podendo constituir uma porta de entrada de microrganismos extra-orais na cavidade pulpar (Theilade 2003).

## 1.2. Distribuição dos microrganismos

As condições para sobrevivência e crescimento da flora microbiana, no sistema de canais radiculares, estão presumivelmente dependentes dos 3 factores seguintes:

- 1) o potencial de oxidação-redução;
- 2) a disponibilidade de nutrientes ;
- 3) os mecanismos de defesa do hospedeiro.

Após a necrose pulpar, deixa de existir aporte de oxigénio para o interior do canal através da circulação e o potencial *redox* torna-se bastante baixo, o que contribui para o aparecimento de condições favoráveis ao desenvolvimento de espécies bacterianas anaeróbias (Dahlen 1998).

Quanto à disponibilidade de nutrientes, esta é variável e resulta de 3 fontes possíveis, nomeadamente: do tecido pulpar necrosado; da difusão de exsudato inflamatório perirradicular e dos fluidos tecidulares através do *foramen* apical, canais laterais e túbulos dentinários permeáveis; ou da difusão de fluidos orais através de lesões de cárie, dos túbulos dentinários, ou por infiltração a partir da restauração coronária (Theilade 2003).

De salientar que os mecanismos de defesa do hospedeiro estão desde logo condicionados pelas especificidades morfológicas próprias do sistema canalar, uma vez que, após necrose pulpar, não existe irrigação sanguínea, impossibilitando por isso a chegada ao interior do canal radicular de células e moléculas de defesa, bem como de antibióticos administrados por via sistémica (Kawashima 2008). Esta limitação da resposta do sistema imunitário, associada ao fácil acesso a nutrientes, transformam o canal radicular num ambiente extremamente favorável ao desenvolvimento e estabelecimento de microrganismos no seu interior. Contudo, as defesas do hospedeiro podem organizar uma resposta ao nível dos tecidos perirradiculares de modo a controlar a disseminação da infecção, evidenciada nos estudos de histologia pela abundante presença de leucócitos polimorfonucleares junto ao *foramen* apical (Dahlen 1998).

A investigação da flora microbiana do espaço pulpar pode ser realizada com recurso a cultura do tecido pulpar necrosado ou do fluido presente no canal. Porém, se pretendermos clarificar qual a localização dos microrganismos são necessárias técnicas de amostragem especiais, estudos de histologia e de ultra-morfologia (Theilade 2003). Os dados obtidos por estas metodologias, indicam

que a maioria dos microrganismos vivem em suspensão no interior do sistema de canais radiculares (Sundqvist 1990; Nair 1997) ou organizados em biofilmes junto às suas paredes (Molven *et al.* 1991; Nair *et al.* 2005), podendo no entanto encontrar-se no interior dos túbulos dentinários (Sen *et al.* 1995; Peters *et al.* 2001; Love 2002a), e, mais raramente, na superfície externa do ápice (Tronstad *et al.* 1990; Noiri *et al.* 2002) ou no interior de lesões periapicais (Happonen *et al.* 1985; Sjögren *et al.* 1988; Sunde *et al.* 2003).

### 1.2.1. Canal radicular

A infecção do canal radicular conduz à necrose de liquefação da polpa. Este tecido necrosado permite o desenvolvimento de múltiplas espécies de microrganismos envolvidos na etiologia da periodontite. Os estudos histológicos com microscopia de luz, de fragmentos radiculares com microscopia electrónica de varrimento, e de secções ultrafinas por microscopia electrónica de transmissão demonstraram a presença de massas polimicrobianas em polpas necrosadas, constituídas por uma mistura de cocos, bastonetes, bactérias filamentosas, espiroquetas e fungos (Nair *et al.* 1990; Sen *et al.* 1995).

A colonização do espaço pulpar pelos microrganismos começa com o seu crescimento na forma planctónica em suspensão na fase líquida. Depois, associam-se sob a forma de comunidades, que usualmente integram várias espécies interdependentes e constituem agregados densos no tecido necrótico. Posteriormente, as células bacterianas podem aderir a superfícies e co-aderir entre si, em camadas únicas ou múltiplas, sintetizando uma matriz extracelular e organizando-se sob a forma de biofilme (Chavez de Paz 2007). Este foi já documentado em estudos de ultramorfologia, nos quais foi possível observar densos agregados de cocos e bastonetes embebidos numa matriz extracelular, localizados ao longo da parede do canal radicular (Nair *et al.* 2005).

### 1.2.2. Túbulos dentinários

A relação do cimento e do esmalte com a dentina, bem como a composição e estrutura da dentina, são factores decisivos no processo de invasão bacteriana dos túbulos dentinários.

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado, duro e poroso, constituído predominantemente por fibras de colagénio do tipo I revestidas por



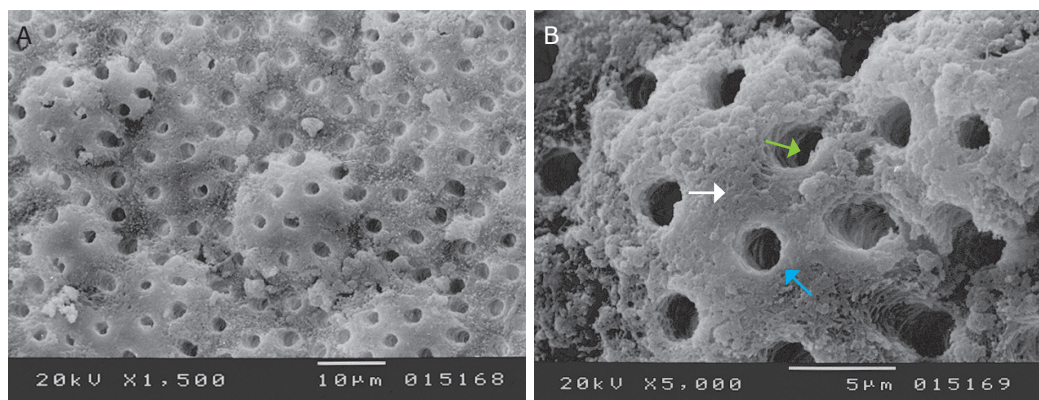
hidroxiapatite. Em menor quantidade estão também presentes outros tipos de colagénio (III, V e VI), proteínas não-colagénicas (osteocalcina, fosfoproteína e sialoproteína dentinária, entre outras) e proteoglicanos (principalmente sulfato de condroitina). A unidade básica do colagénio é o tropocolagénio, que tem um peso molecular de 28,500 Dalton, sendo constituído por 3 cadeias polipeptídicas superenroladas, cada uma delas com cerca de 1056 aminoácidos. No colagénio do tipo I, duas das três cadeias são idênticas, designadas de  $\alpha$ -1, e a outra é distinta, designada como  $\alpha$ -2. A cadeia de aminoácidos consiste numa sequência repetitiva de Glicina-X-Y, onde X e Y representam outros aminoácidos. O colagénio tipo I da dentina apresenta uma proporção de hidroxilisina e um número de ligações cruzadas intra e intermoleculares superior ao existente na pele ou no osso. Estas ligações aumentam a estabilidade estrutural e a resistência das fibras de colagénio da dentina (Nanci 2003).

A matriz da dentina é formada pelos odontoblastos, que iniciam a secreção de colagénio ao nível da junção amelo-dentinária e continuam a sua deposição deslocando-se em direcção centrípeta, deixando para trás o processo odontoblástico, em torno do qual a matriz de dentina é elaborada e mineralizada. A dentina primária e a secundária, formadas respectivamente antes e após a erupção do dente, têm ambas uma estrutura tubular típica. Os túbulos dentinários percorrem um trajecto desde a junção pulpo-dentinária até às junções cemento-dentinária ou amelo-dentinária, e contêm no seu interior o processo odontoblástico, fibras de colagénio não-mineralizadas, fluido dentinário e fibras nervosas (Dai *et al.* 1991). O fluido dentinário consiste num transudato de plasma oriundo da microcirculação pulpar, ocupa cerca de 22% do volume do túbulo dentinário e a sua constituição é similar ao líquido intersticial. Devido à acção da pressão intrapulpar, o fluxo do fluido dentinário tem direcção periférica e dificulta a penetração microbiana em dentes vitais (Pashley 1996). Também foi demonstrada a presença de albumina, fibrinogénio e imunoglobulina G no fluido, esta última com capacidade de promover a formação de imunocomplexos e dificultar a invasão bacteriana da polpa (Love 2002b).

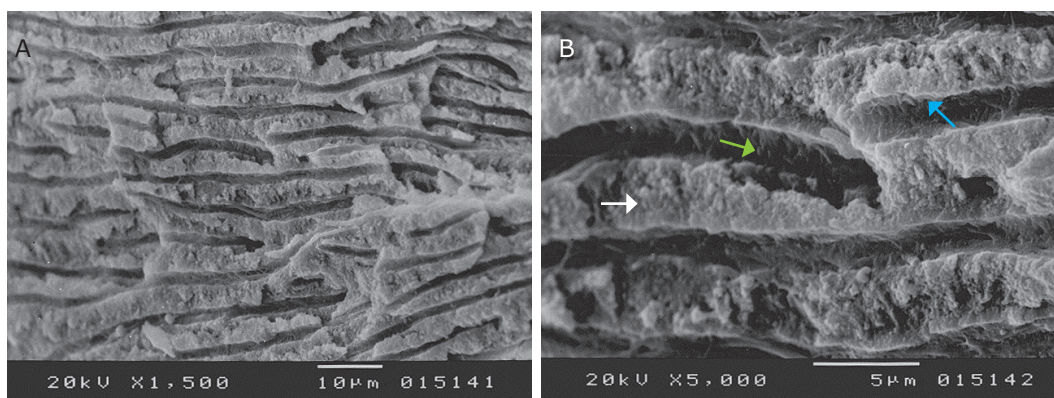
O número, o tamanho e a densidade dos túbulos dentinários variam consoante a localização. Na proximidade da junção amelo-dentinária existem cerca de 15.000 túbulos/mm<sup>2</sup>, com um diâmetro médio de 0,9  $\mu$ m e que ocupam apenas 1% da superfície total. No seu percurso em direcção à polpa, o diâmetro dos túbulos e a sua densidade aumentam, existindo na proximidade da junção dentino-pulpar aproximadamente 45.000 túbulos/mm<sup>2</sup>, com um diâmetro médio de 2,5  $\mu$ m, que ocupam cerca de 22% da superfície total da dentina (Figs.

1 e 2) (Garberoglio e Brannstrom 1976). A sua dimensão e número aumentam também do ápice em direcção à coroa (Torabinejad *et al.* 2002).

A matriz de colagénio da dentina intertubular possui um grau de mineralização que atinge cerca de 30% do volume, enquanto que a dentina peritubular é à partida muito mais mineralizada, contendo cerca de 95% do volume preenchido por cristais de hidroxiapatite, podendo este valor aumentar ainda com a idade (Marshall 1993). Este fenómeno está associado a uma diminuição do tamanho do lúmen e, por vezes mesmo obliteração dos túbulos, sendo designado de esclerose dentinária. O citado processo pode ser fisiológico ou resultar da resposta a um estímulo nocivo, verificando-se que para o primeiro caso tem início na região apical da raiz e posteriormente progride em direcção coronária (Stanley *et al.* 1983).



Figuras 1A e 1B – Imagem de microscopia electrónica de varrimento (MEV) da parede apical do canal radicular, onde é visível o tamanho e a densidade dos túbulos dentinários. Túbulo dentinário (seta verde), dentina peritubular (seta azul) e dentina intertubular (seta branca). Vista frontal.



Figuras 2A e 2B – Imagem de MEV do trajecto dos túbulos dentinários. Túbulo dentinário (seta verde), dentina peritubular (seta azul) e dentina intertubular (seta branca). Vista sagital.

A dentina terciária, reparadora ou reaccional, é um tecido mineralizado, desprovido da estrutura tubular típica da dentina, produzido pela polpa em resposta a estímulos nocivos, responsável pela diminuição do volume da cavidade pulpar verificado ao longo da vida (Stanley *et al.* 1983).

Os túbulos dentinários têm uma configuração tronco-cônica, de base pulpar, cujo diâmetro é compatível com a penetração e multiplicação de microrganismos, tendo sido identificadas bactérias e fungos nos túbulos expostos de dentes com polpa viva assim como com polpa necrosada (Ando e Hoshino 1990; Nair *et al.* 1990a; Nagaoka *et al.* 1995; Sen *et al.* 1995).

Após o estabelecimento dos microrganismos no canal radicular também existe a possibilidade dos mesmos invadirem os túbulos dentinários. Shovelton, em 1964, avaliou histologicamente 97 dentes necrosados extraídos, e constatou que 61 deles apresentavam penetração bacteriana nos túbulos dentinários radiculares. No entanto, o número e a profundidade de infecção dos túbulos variavam bastante entre os dentes e entre diferentes secções do mesmo dente. Ainda assim, foi possível encontrar uma associação entre a história clínica e a presença de bactérias nos túbulos, evidenciando-se uma invasão tubular mais pronunciada nos casos que apresentavam lesão crónica do tipo granuloma ou lesão apical radiograficamente visível (Shovelton 1964).

Noutro estudo histológico, realizado por Sen e colaboradores em 1995, sobre 10 dentes extraídos com necrose pulpar, cujos canais estiveram expostos à flora oral por tempo indeterminado, observou-se uma penetração das bactérias nos túbulos dentinários que atingiu em média os 50µm, contudo verificou-se que nalguns casos a progressão ocorreu até aos 150 µm. Esta profundidade máxima de infecção é ainda próxima do lúmen do canal radicular e relativamente acessível mecanicamente se considerarmos que a diferença de diâmetro entre duas limas sequenciais é de 50 µm. Um achado interessante deste estudo foi a observação de uma grande infecção por fungos tipo levedura, junto à parede do canal, em 4 dos espécimes estudados (Sen *et al.* 1995).

Armitage e colaboradores, em 1983, compararam histologicamente 20 dentes com diagnóstico de pulpíte e 20 dentes com canais necrosados. A invasão bacteriana dos túbulos ocorreu apenas nos canais infectados e atingiu até metade da distância entre a parede pulpar e a junção cimento-dentinária. Além disso, 35% dos dentes infectados apresentaram alterações estruturais da superfície do cimento, o que não se verificou em nenhum dos dentes com pulpíte. Os autores sugerem que as bactérias invasoras dos túbulos produzem enzimas e outros produtos do metabolismo capazes de desnaturarem o colagénio e induzirem modificações do cimento, dando origem a alterações da sua estrutura designadas de grânulos patológicos (Armitage *et al.* 1983).

### 1.2.3. Superfície externa do ápice radicular

A superfície externa do ápice também pode ser colonizada por microrganismos em dentes com necrose pulpar e lesão periapical radiograficamente visível. Neste ponto é de referir um estudo de Tronstad e colaboradores, em 1990, que teve como objectivo avaliar casos clínicos de insucesso pós-tratamento endodôntico em situações consideradas refractárias ao tratamento convencional, e que por isso necessitavam de cirurgia periapical. No decurso da cirurgia foram realizadas colheitas para cultura bacteriana e removidos os ápices para análise por microscopia electrónica de varrimento. A amostra foi composta por 5 casos diagnosticados como periodontite apical assintomática e outros 5 casos de periodontite apical com fístula. Todos os espécimes apresentaram crescimento de microrganismos com predomínio de bactérias anaeróbias. Macroscopicamente todos os ápices removidos tinham aspecto limpo. Na análise de microscopia o cemento do ápice radicular apareceu coberto por largos feixes de fibras e células, revestidos por uma película lisa, em camada contínua, não-estruturada, no interior da qual puderam ser identificadas bactérias de morfologia variada. Observou-se também a presença de placa bacteriana em irregularidades e criptas da superfície externa do cemento. O biofilme observado apresentava uma espessura heterogénea de material extracelular amorfo, tornando difícil a identificação das bactérias presentes no seu interior. Ainda assim, foi possível constatar um predomínio de cocos e bastonetes, encontrando-se também algumas formas filamentosas, por vezes com cocos aderidos à sua superfície. As bactérias encontravam-se organizadas em colónias e embebidas no biofilme (Tronstad *et al.* 1990).

Dentro do mesmo contexto, Noiri e colaboradores estudaram, por microscopia electrónica de varrimento, onze casos de lesões refractárias ao tratamento. A presença de biofilme bacteriano extrarradicular foi observada em 9 dos casos avaliados. É de salientar que, em 5 casos, foram removidos e analisados cones de guta-percha que se encontravam em contacto directo com os tecidos periapicais. A sua observação revelou a presença de uma estrutura tipo glicocálice em toda a sua periferia. Nos dentes extraídos a superfície radicular externa encontrava-se colonizada por longos bastonetes e bactérias de morfologia filamentosa (Noiri *et al.* 2002).

Por outro lado, Siqueira e Lopes avaliaram dentes com periodontite apical crónica, sem tratamento endodôntico prévio, e conseguiram identificar bactérias na superfície externa da raiz em apenas 1 das 27 amostras analisadas (4%). A morfologia em que foram observadas apresentou características específicas,

numa organização designada de “espiga”, resultante da co-agregação de cocos em torno de formas filamentosas. As restantes amostras evidenciaram a presença de grandes aglomerados de microrganismos junto ao *foramen* apical, incluindo cocos e bastonetes, todavia limitados ao interior do canal (Siqueira e Lopes 2001).

As publicações existentes acerca deste tema apontam no sentido de existir uma probabilidade significativamente maior de encontrar a superfície externa da raiz colonizada em casos de patologia persistente após tratamento, do que em infecções primárias.

#### 1.2.4. Tecido periapical

Nos últimos anos, tem sido contestado o conceito clássico de que, em dentes com periodontite apical assintomática, os microrganismos infectantes se encontram alojados no interior do sistema de canais radiculares e nos túbulos dentinários, enquanto que a lesão periapical se encontra livre dos mesmos (Andreasen e Rud 1972; Langeland *et al.* 1977).

Analizando as publicações existentes acerca deste tema, é razoável pensar que, durante uma fase inicial, os mecanismos de defesa do organismo são capazes de eliminar as bactérias com origem no canal que tentam invadir os tecidos periapicais. Todavia, em infecções de natureza crónica, com a microflora permanente do canal radicular no seu apogeu, as defesas do hospedeiro podem ser menos efectivas e permitir a invasão microbiana da lesão periapical (Happonen *et al.* 1985; Hornef *et al.* 2002; Sunde *et al.* 2003).

Um dos primeiros estudos que suportam a existência de microrganismos em lesões periapicais crónicas foi apresentado por Happonen e colaboradores, em 1985. Neste estudo, foram realizadas biópsias em 7 lesões periapicais que não regrediram após tratamento endodôntico convencional. As amostras foram preparadas histologicamente e coradas por técnicas de imunocitoquímica, nas quais se detectou a presença de *Actinomyces israeli*, *Actinomyces naeslundii* e *Propionibacterium propionicum*, associados ou independentes, em todos os espécimes estudados (Happonen *et al.* 1985).

Posteriormente, foi publicado um caso clínico de uma lesão periapical, tratada durante 4 sessões, com obturação canalar efectuada apenas após atingir uma cultura negativa. Ao fim de um ano o controlo pós-operatório revelou um aumento da dimensão da radiotransparência apical. Por conseguinte, foi realizada



cirurgia, com colheita para cultura microbiológica e biópsia com coloração imunocitoquímica. Ambos os métodos detectaram a presença de *Propionibacterium propionicum*, que já tinha sido detectado nas culturas bacterianas realizadas no final das 3 primeiras sessões de tratamento, o que sugeriu que a lesão apical tenha sido colonizada por microrganismos oriundos da infecção do canal radicular (Sjögren *et al.* 1988).

Corroborando os achados anteriores, Sunde e colaboradores, estudaram uma série de 36 dentes com periodontite apical refractária ao tratamento convencional e sujeitos a cirurgia apical. Os métodos de análise aplicados envolveram a cultura microbiológica, a microscopia electrónica de varrimento e de transmissão. À excepção de uma, todas as culturas oriundas de tecidos das 36 lesões apresentaram crescimento microbiano positivo, sendo 51% das bactérias identificadas estirpes anaeróbias. Em 25% das amostras foram encontrados grânulos sulfurosos, de cor amarela e brilhantes, de 3 a 4 milímetros de diâmetro, a partir dos quais se cultivaram várias espécies do género *Actinomyces*, bem como outras espécies de bactérias Gram-positivas e negativas. A microscopia electrónica evidenciou a presença de bastonetes e espiroquetas rodeadas de material extracelular amorfo, bem como calcificações no interior dos grânulos, fazendo lembrar a estrutura de um biofilme (Sunde *et al.* 2002).

Num estudo mais recente do mesmo grupo, uma série de 39 pacientes, com diagnóstico de periodontite apical assintomática, foram sujeitos a cirurgia apical e o material colhido estudado por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e microscopia de varrimento com LASER confocal. A conjugação destas técnicas permitiu identificar a presença de bactérias, o seu tipo e a sua localização tridimensional. Metade das lesões analisadas mostraram bactérias presentes no seu interior. Foram observados cocos, espiroquetas e bastonetes, formando microcolónias, a ocuparem zonas localizadas e muito restritas. No entanto, a maioria do volume da lesão e a sua periferia encontravam-se livres de bactérias (Sunde *et al.* 2003).

### **1.3. Ecologia da população microbiana em infecções primárias**

A periodontite apical primária é uma reacção inflamatória, organizada em resposta à infecção polimicrobiana do tecido pulpar necrosado e das paredes dos canais radiculares.

Mais de 300 espécies bacterianas foram já cultivadas a partir da flora microbiana da cavidade oral (Sundqvist 1992a) e, na actualidade, com recurso

a técnicas de biologia molecular, o número de espécies identificadas subiu para 700, pertencentes a 11 filos diferentes do reino *Bacteria*, mais de metade destas conhecidas apenas pela sequência de genes 16S RNA<sub>r</sub> (filotipo) (Siqueira e Roças 2005). Teoricamente todas estas espécies têm potencial para invadir o espaço pulpar após a necrose e participar na infecção, contudo, apenas um grupo restrito tem sido identificado no interior dos canais infectados, pelo que convém procurar compreender as razões subjacentes a este fenómeno (Byström e Sundqvist 1985; Siqueira *et al.* 2004; Siqueira e Roças 2005a; Siqueira e Roças 2005b).

### 1.3.1. Pressões selectivas e dinâmica da infecção primária

Como foi anteriormente referido, o tipo de microrganismos que tem inicialmente acesso ao sistema de canais radiculares está dependente do nicho ecológico de origem e da via de colonização. Desde que encontrem um *habitat* com condições para o seu desenvolvimento inicial, os microrganismos multiplicam-se e organizam-se posteriormente em comunidades com elevado grau de interdependência entre as espécies (Sundqvist 1992a; Sundqvist 1992b; Socransky 1997; Siqueira 2008).

O canal radicular possui um ambiente único no qual existe uma elevada pressão biológica. Os factores de selecção determinantes do sucesso ou fracasso da sua colonização englobam: a adesão e a co-agregação bacteriana, a temperatura, o pH, a concentração de oxigénio, o potencial de oxidação-redução, os nutrientes disponíveis a partir do hospedeiro e, além disso, o estabelecimento de relações de sinergismo ou antagonismo entre diferentes espécies microbianas. Com o decorrer do tempo, o equilíbrio entre as condições do meio local e as relações de competição e cooperação dos microrganismos conduzem ao estabelecimento de uma comunidade denominada *climax* (Theilade 2003).

A dinâmica de evolução da microflora canalar humana, desde a colonização até ao estabelecimento de uma comunidade *climax*, permanece desconhecida. Não obstante, os estudos experimentais realizados em animais podem ajudar-nos a compreender as modificações que vão ocorrendo. Fabricius e colaboradores, em 1982, e dando continuidade aos trabalhos iniciados no grupo por Möller, realizaram alguns dos estudos que mais contribuíram para clarificar este tema. Numa das experiências, lesaram mecanicamente as polpas de dentes de macaco, deixando-as expostas à flora oral durante uma semana e, após este período, restauraram os dentes definitivamente. Posteriormente, foram realizadas colheitas para cultura microbiológica ao fim de 7, 90, 180 e 1060 dias, avaliando

consecutivamente a flora encontrada. Quanto mais tempo os canais permaneceram fechados maior foi o predomínio das estirpes anaeróbias obrigatórias sobre as facultativas identificadas nas culturas. A análise quantitativa revelou que, aos 7 dias, metade das espécies encontradas eram anaeróbias facultativas e 50% obrigatórias, enquanto que passados 90, 180 e 1060 dias, a percentagem foi aumentando, respectivamente, para 85%, 95% e 98% de anaeróbias obrigatórias, com um aumento da prevalência de espécies de *Bacteroides* e bastonetes Gram-positivos (Fabricius *et al.* 1982b).

Outro estudo desenvolvido pelo mesmo grupo, também com macacos, avaliou a capacidade de 11 estirpes bacterianas diferentes, em culturas puras ou mistas, induzirem o aparecimento de periodontite apical. Para isso, a partir do canal radicular de um dente de macaco com uma lesão periapical grave, desenvolvida num estudo anterior, foi isolada uma colecção bacteriana completa, constituída por oito espécies diferentes. No estudo presente foi realizada a preparação canal, com técnica aséptica, em 75 dentes. Em 12 destes dentes foi inoculada a colecção completa de 8 estirpes mantendo as proporções originais. Os outros 63 dentes foram inoculados com diferentes combinações e proporções de bactérias ou estirpes únicas. No final do período experimental, aos 6 meses, constatou-se não ser possível re-isolar microrganismos a partir de nenhum dos 9 canais inicialmente inoculados com *Bacteroides* em cultura pura, ao passo que nos casos inoculados com culturas mistas o *Bacteroides oralis* dominava a flora residente. Já os *Enterococcus* foram recuperados a partir de todos os canais onde foram inoculados em cultura pura, demonstrando capacidade para sobreviver isoladamente no interior do canal radicular, sem necessidade do suporte por parte de outras espécies (Fabricius *et al.* 1982a).

Noutro trabalho do mesmo grupo os canais de dentes de macaco foram inoculados com 3 espécies bacterianas isoladas ou em diferentes combinações. No final do período experimental, aos 6 meses, foi avaliado o desenvolvimento de lesões periapicais e a flora microbiana dos canais. Verificou-se que as estirpes inoculadas isoladamente sobreviveram no canal, porém, não desencadearam lesão periapical significativa. Pelo contrário, a inoculação das várias espécies associadas causou infecção mista e o desenvolvimento de lesões periapicais graves (Dahlen *et al.* 1982a). Estes achados foram confirmados e ampliados por estudos posteriores que demonstraram uma maior agressividade da combinação de espécies anaeróbias facultativas e obrigatórias sobre as monoculturas na colonização de canais e indução de lesões apicais (Sundqvist 1993; Sobrinho *et al.* 1998; Fabricius *et al.* 2006).



Estas investigações, analisadas em conjunto, permitem concluir que o canal radicular é um *habitat* bastante selectivo, com condições favoráveis ao estabelecimento de bactérias anaeróbias estritas, onde as relações estabelecidas entre diferentes espécies podem favorecer o seu desenvolvimento individual e a manifestação de mecanismos patogénicos mais sofisticados.

Assim podemos elaborar a seguinte sequência: a maior concentração de oxigénio e a disponibilidade inicial de hidratos de carbono e de nutrientes do tecido necrosado, são factores que favorecem no começo o estabelecimento de bactérias aeróbias e facultativas. Como resultado do metabolismo destas espécies, existe um consumo de oxigénio com produção de dióxido de carbono e hidrogénio e, conseqüentemente, o desenvolvimento de um ambiente com baixo potencial de oxidação-redução. Estas alterações induzidas no canal pelos colonizadores iniciais criam condições favoráveis ao desenvolvimento de bactérias anaeróbias. Além disso, a progressiva degradação do pequeno volume de polpa conduz a um rápido esgotamento desta fonte de proteínas que, entretanto é suplementada pelas proteínas plasmáticas oriundas da inflamação desencadeada nos tecidos perirradiculares pelos microrganismos. Esta diminuição do oxigénio disponível e as alterações no aporte de nutrientes conduzem a uma alteração da flora, com diminuição das bactérias anaeróbias facultativas e um predomínio das obrigatórias. As primeiras crescem sem dificuldades em ambiente de anaerobiose, mas a sua principal fonte de nutrientes são os hidratos de carbono. Se não existir contacto directo com a cavidade oral, a chegada destes nutrientes ao interior do canal fica comprometida, o que limita bastante a sua capacidade de crescimento. Por outro lado, a posterior chegada de proteínas e aminoácidos a partir do exsudato periapical garantem o desenvolvimento e o favorecimento dos anaeróbios obrigatórios (Sundqvist 1992b; Sundqvist e Figdor 2003; Figdor e Sundqvist 2007).

Nesta fase, o crescimento de microrganismos que requerem hidratos de carbono como fonte de energia fica limitado, e a infecção do canal passa a ser dominada pelas bactérias com capacidade proteolítica ou que mantêm relações de sinergia com espécies capazes de utilizar proteínas ou aminoácidos como substrato. O metabolismo bacteriano do fluido plasmático proporciona uma diminuição adicional do potencial *redox* e uma subida concomitante do pH (Marsh 2003), condições que promovem o desenvolvimento de espécies de *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*, características de uma flora que atingiu o apogeu. Apesar dos estudos permitirem já a compreensão da evolução da microflora, desconhece-se ainda o tempo necessário para que uma comunidade *climax* se desenvolva no interior do canal radicular (Siqueira 2008).

### 1.3.2. Sinergismo e antagonismo microbiano

Dado que o canal radicular é, à partida, um local estéril, a flora canalar é constituída por microrganismos oportunistas. A competição entre eles começa no momento da colonização e as suas interacções regulam a evolução da comunidade em desenvolvimento. Para além da competição por espaço e nutrientes, factores de antagonismo como a produção de metabolitos tóxicos, tais como o peróxido de hidrogénio, a amónia, os compostos de enxofre e diversos ácidos, podem lesar e prejudicar gravemente a sobrevivência de outros microrganismos. É também de salientar a produção de bacteriocinas que são moléculas de alto peso capazes de inibirem o crescimento de outras espécies bacterianas (Sundqvist 1992).

Por outro lado, são conhecidas várias espécies que beneficiam da presença de outras. Esta interacção positiva é frequentemente bilateral (simbiose), ou seja, ambas as espécies beneficiam uma da outra em simultâneo. O consumo de oxigénio pelas bactérias facultativas com favorecimento das espécies anaeróbias estritas é um bom exemplo de benefício pela presença de outras espécies. Outra situação interessante é a degradação de imunoglobulinas e outras proteínas, realizada por algumas espécies, que, ao destruírem factores de defesa do hospedeiro protegem todas as espécies e, ainda, libertam peptídeos e aminoácidos que podem servir como nutrientes a outros microrganismos. As interacções microbianas positivas e negativas seleccionam as espécies bacterianas que estão presentes em simultâneo e as que se evitam, contribuindo assim para a regulação da flora (Sundqvist 1992a).

As associações entre espécies microbianas podem ser determinadas em função da razão de probabilidade (*odds ratio*) de encontrar ou não uma espécie na presença de outra. Considera-se uma associação positiva quanto a razão de probabilidade de detectar uma espécie na presença de outra está acima de 2, enquanto que duas espécies são consideradas em associação negativa quando a probabilidade de encontrar uma na presença da outra é  $< 0,5$  (Gomes *et al.* 1994; Peters 2002).

### 1.3.3. Factores de virulência

Os factores de virulência incluem componentes celulares estruturais e produtos secretados. A sua maioria têm um papel fisiológico ou estrutural nos microrganismos e a sua capacidade para causar danos nos tecidos do hospedeiro não é um objectivo primordial mas antes uma consequência. Podem estar

envolvidos na ligação a superfícies do hospedeiro, invasão de células e tecidos, propagação, destruição tecidular directa ou indirecta, ou estratégias de sobrevivência como a evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Siqueira 2008).

O lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido como endotoxina, é uma molécula anfipática predominante na constituição da camada exterior da membrana externa da maioria das bactérias Gram negativas. O LPS é constituído por um polissacarídeo hidrofílico (que contém o antígeno-O) e por um componente glicolípídico hidrofóbico, designado de lipídeo A. A molécula de LPS é virtualmente inofensiva enquanto incorporada na membrana externa bacteriana, contudo, após a sua libertação da parede celular, o lipídeo A estimula as células do sistema imunitário e é capaz de despoletar uma resposta inflamatória. A maioria dos efeitos atribuídos ao LPS dependem da sua interacção com as células do hospedeiro, e o macrófago parece ser a célula chave neste processo. Após a sua libertação da bactéria, o LPS liga-se a uma proteína plasmática denominada proteína de ligação do LPS e é depois transportado até ao CD14 ("Cluster of differentiation"), um co-receptor celular do LPS que actua em conjunto com o TLR-4 ("Toll-like receptor"), existentes na superfície do macrófago, que uma vez activados desencadeiam a resposta celular (Rietschel e Brade 1992). Um estudo de experimentação animal, realizado em macacos, demonstrou que a inoculação de LPS de *Fusobacterium nucleatum* no interior dos canais radiculares foi suficiente para provocar reacção inflamatória nos tecidos periapicais de todos os dentes testados, tendo sido também evidenciada, na maioria dos casos, reabsorção óssea e cementária ao nível apical (Dahlen *et al.* 1981).

Os ácidos teicóico e lipoteicóico são polímeros aniónicos que constituem uma parte substancial da parede celular das bactérias Gram-positivas. O ácido lipoteicóico é libertado após lise bacteriana e constitui um dos seus principais antígenos, com efeitos biológicos semelhantes aos desencadeados pelo LPS das bactérias Gram-negativas (Ginsburg 2002).

A maioria das bactérias produz também uma bateria de enzimas, entre elas algumas hidrolíticas, capazes de degradar os componentes da matriz extracelular e danificar a estrutura dos tecidos do hospedeiro, facilitando desse modo a sua invasão. As proteases são enzimas de secreção extracelular ou integradas na superfície celular das bactérias, capazes de hidrolisar as ligações peptídicas das proteínas. Estas podem contribuir para a patogénese da periodontite apical através de diversos mecanismos, entre eles, ou pela degradação directa de componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo, pela agressão indirecta por activação das metaloproteinases da matriz do hospedeiro e pela inactivação de imunoglobulinas ou do sistema do complemento (Theilade 2003).

## 2. Métodos de controlo e erradicação da infecção canal

O objectivo principal do tratamento endodôntico é a prevenção ou tratamento da periodontite apical, ou mais precisamente, a eliminação ou prevenção da infecção do sistema de canais radiculares. É evidente que em situações como reabsorções ou complicações intraoperatórias existe uma variedade de outros objectivos secundários mas, mesmo nestes casos, o sucesso final depende do controlo eficaz da componente microbiana (Spangberg 1998).

O prognóstico do tratamento endodôntico fica substancialmente comprometido se existirem bactérias intrarradiculares cultiváveis aquando da obturação. Um estudo prospectivo, realizado em dentes com periodontite apical primária, tratados numa única sessão, com “follow-up” clínico e radiográfico de 5 anos, revelou que os dentes com cultura microbiológica positiva pós-preparação, apresentaram uma taxa de sucesso 26% inferior aos dentes com cultura negativa (estes alcançaram uma taxa de sucesso de 94%) (Sjögren *et al.* 1997). Esta investigação evidencia, de forma clara, a importância de reduzir ao máximo a presença de bactérias no canal antes da sua obturação.

Devido às especificidades anatómicas do sistema de canais radiculares, a eliminação da infecção endodôntica é um processo diferente do controlo e erradicação que ocorrem na maioria das outras localizações do corpo humano, onde a resposta desencadeada pelo sistema imunitário do hospedeiro consegue habitualmente eliminar a infecção. No caso do sistema de canais radiculares, as defesas do hospedeiro não conseguem actuar *in loco*, pelo que a sua resolução implica um esforço concertado de diversos factores do hospedeiro e do tratamento instituído. Só a adequada cooperação entre todos estes elementos pode conduzir à eliminação dos microrganismos infectantes e à cura da periodontite apical. Os elementos necessários para o controlo e eliminação da infecção endodôntica incluem:

- 1) a resposta imunológica do hospedeiro;
- 2) nalguns casos a antibioterapia sistémica;
- 3) a preparação biomecânica;
- 4) a medicação intracanal com antissépticos locais;
- 5) a obturação tridimensional do canal; e
- 6) a restauração coronária.

## 2.1. Resposta do hospedeiro

### 2.1.1. Resposta dos tecidos periapicais

O ideal histológico almejado com o tratamento endodôntico é o encerramento biológico do *foramen* apical com cimento secundário (Ricucci e Langeland 1998). Os estudos de experimentação animal evidenciaram a formação de tecido “tipo-cimento” durante os processos de reparação apical. Este pode ser formado de modo previsível em resposta a determinados materiais e técnicas específicas (Holland e de Souza 1985; Leonardo *et al.* 1999). Não obstante, o selamento biológico apical com tecido duro nem sempre é completo ou expectável, sendo mesmo questionável a sua obtenção na maioria dos casos (Leonardo *et al.* 1998).

A ausência de inflamação dos tecidos periapicais é, sem dúvida, o maior indicador histológico de se ter atingido sucesso com o tratamento endodôntico. Todavia, numa perspectiva clínica, o sucesso é avaliado com base na ausência de sinais e sintomas de infecção, bem como na integridade da lâmina dura, ou seja, na normalidade radiográfica dos tecidos periapicais (Strindberg 1956; Ørstavik *et al.* 1986; Friedman 1998). Apesar disso, a cura clínica nem sempre tem uma correlação directa com a cura histológica. Este facto tornou-se evidente após os trabalhos clássicos de análise histológica dos tecidos periapicais de cadáveres humanos, nos quais dentes avaliados radiograficamente e classificados como sucessos se encontravam frequentemente associados à existência de inflamação histológica ligeira ou moderada. Por outro lado, todos os dentes que apresentavam radiotransparências apicais mostraram reacção inflamatória (Brynolf 1967; Green *et al.* 1997). No entanto, é ainda necessário esclarecer as implicações da inflamação residual do ligamento periodontal não associada a manifestações clínicas ou radiográficas, bem como por quanto tempo persistirá a inflamação histológica na ausência de agressão microbiana dos tecidos.

Importa salientar que após a biopulpectomia a reparação dos tecidos perirradiculares é assegurada por células do ligamento periodontal. Este é um tecido conjuntivo especializado, cuja espessura varia entre os 0,15 e os 0,38 milímetros, com a zona mais fina em torno do terço médio da raiz. O ligamento periodontal é constituído por células, matriz extracelular, vasos e nervos (Fig. 3). As principais células presentes são os fibroblastos (maioritárias), os osteoblastos e os osteoclastos (a revestir a superfície óssea do ligamento), os cementoblastos (na superfície cementária do ligamento), as células epiteliais, os macrófagos e as células mesenquimatosas indiferenciadas. A matriz extracelular é composta princi-

palmente por feixes de fibras de colagénio, embebidas na substância fundamental, composta por glicosaminoglicanos, glicoproteínas e glicolípidos. Os constituintes do ligamento periodontal estão constantemente a ser sintetizados, removidos e substituídos. Os fibroblastos são as células preponderantes no “turnover” da matriz, sendo simultaneamente capazes de sintetizar e degradar o colagénio, que é continuamente remodelado, sendo também eles próprios frequentemente renovados (Ten Cate 1985). Esta elevada actividade metabólica é suportada por uma rede vascular bem desenvolvida, com origem nas artérias alveolar superior e inferior e por um eficiente sistema de drenagem linfática. O elevado “turnover” do ligamento permite-lhe uma extraordinária capacidade de adaptação a novas condições locais e de se reparar a si mesmo após diversos tipos de agressão (Beertsen *et al.* 1997).

Para ajudar a compreensão da resposta tecidular convém ainda referir que existem dois tipos de cemento: o primário, acelular, que se desenvolve lentamente durante o período de erupção dentária e o secundário, celular, formado após o dente entrar em oclusão. A espessura da camada de cemento que recobre a raiz aumenta desde a junção amelo-cementária até à região apical, onde é fundamentalmente do tipo celular, continuando a sua deposição ao longo da vida (Ten Cate 1985).



Figura 3 – Imagem de microscopia de luz do periodonto de um dente de cão. Cemento (1), ligamento periodontal (2), osso alveolar propriamente dito (3) e sistema de Havers (4).



Os estudos de experimentação animal demonstram que mesmo após o alargamento do *foramen* apical, com sobreinstrumentação, é possível observar o crescimento dos tecidos perirradiculares para o interior dos canais e a formação de tecido duro a encerrar o defeito criado (Tronstad 1978; Holland e de Souza 1985). Não obstante, apesar destes estudos demonstrarem a elevada capacidade de regeneração dos tecidos periapicais, na ausência de infecção concomitante, há que considerar que são estudos em animais e a sua extrapolação para os humanos não pode ser directa, tendo em conta, entre outros factores, a maior capacidade de regeneração de espécies filogeneticamente inferiores. Além disso, é de salientar que, na clínica, o alargamento do *foramen* apical é desaconselhado, dado que pode resultar numa perda de controlo do limite apical e aumento de complicações pós-operatórias, devidas ao maior risco de contacto entre os agentes farmacológicos, biológicos e materiais de obturação com os tecidos perirradiculares (Schilder 1974).

Após a obturação canal, vários eventos podem ter lugar na região periapical. No caso de ocorrer a acumulação de raspas de dentina não contaminadas junto ao *foramen* apical, será desencadeada uma resposta com deposição de tecidos duros e tentativa de encerramento, estimulada pela biocompatibilidade e pelos factores de crescimento contidos neste material biológico (Tronstad 1978). Se, por outro lado, houve permeabilização do *foramen* e eliminação dos microrganismos, mas o material de obturação não preencheu a porção mais apical do canal, então, iniciar-se-á a invaginação do tecido periodontal para dentro do canal (Holland *et al.* 1979). Pelo contrário, se as raspas de dentina se encontrarem contaminadas por microrganismos, ou se os mesmos persistirem no trajecto do *foramen* permeabilizado, a evolução da resposta tecidular irá depender da quantidade e dos factores de virulência microbiana, bem como dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Siqueira 2001a). Outro possível cenário será a persistência de restos de medicação intracanal, como o hidróxido de cálcio ou a clorohexidina, entre o material de obturação e o *foramen* apical com a sua posterior solubilização pelos fluidos apicais ou fagocitose, sendo depois substituídos por tecido periodontal (Holland *et al.* 1979). Não obstante, o enquadramento mais desejável será o preenchimento do espaço canal preparado com material de obturação, para o qual a resposta desencadeada pelo hospedeiro dependerá fundamentalmente da sua biocompatibilidade, solubilidade e assepsia (Ricucci e Langeland 1998).

Contudo, a longo prazo os tecidos periapicais de canais obturados poderão vir a ser novamente alvo de agressão, quer por bactérias que permaneceram no interior dos canais e encontraram de novo um ambiente propício ao seu crescimento, quer pela entrada de novos microrganismos por meio de microinfiltração coronária (Saunders e Saunders 1994; Ray e Trope 1995; Friedman *et al.* 1997).

### 2.1.2. Resposta celular

A lesão periapical constitui um local de combate entre a resposta imunitária e a infecção pulpar, sendo o seu propósito conter a infecção do canal radicular e impedir a sua propagação aos tecidos periapicais e ao osso alveolar adjacente (Stashenko 1990).

O estudo da dinâmica das respostas dos tecidos periapicais à exposição pulpar, utilizando o rato como modelo experimental, revelou que a resposta periapical inicial, durante os primeiros 3 dias, envolve a migração de células polimorfonucleares e monócitos (Akamine *et al.* 1994). Neste modelo, a necrose pulpar progressiva tem início ao segundo dia e ao fim de sete dias já existe destruição do osso periapical. Entre o sétimo e o vigésimo dia ocorre uma destruição óssea rápida (fase activa), com uma subsequente diminuição da velocidade de reabsorção (fase crónica). Os estudos de cinética sugerem que, após os primeiros dias, existem poucas diferenças temporais no infiltrado celular. Uma excepção notável é o aumento de linfócitos T supressores à medida que a lesão se torna crónica (Kawashima *et al.* 1996). Este fenómeno pode reflectir uma resposta específica dos linfócitos T, dado que a exposição dos linfócitos T “helper” ao antigénio estimula a sua proliferação e, subsequentemente, induz o desenvolvimento de linfócitos T supressores que podem baixar a excessiva imunorreactividade nas lesões periapicais (Morimoto *et al.* 1985).

A composição do infiltrado de células inflamatórias presentes nas lesões periapicais crónicas de humanos e animais foi já caracterizado. As células presentes constituem um infiltrado misto que inclui linfócitos B e T, polimorfonucleares, macrófagos, plasmócitos, células “natural killer” e mastócitos (Kopp e Schwarting 1989). Os estudos encontram-se divididos quanto ao tipo de células predominantes nas lesões periapicais, desconhecendo-se ainda se são os macrófagos ou os linfócitos as mais numerosas. No entanto, reconhece-se que os linfócitos T ultrapassam em número os B de forma consistente e os polimorfonucleares também representam uma parte significativa da população celular das lesões crónicas (Kawashima 2008). Para além das células do infiltrado inflamatório e dos fibroblastos, 45% dos granulomas periapicais apresentam tecido epitelial na sua constituição (Ramachandran Nair *et al.* 1996).



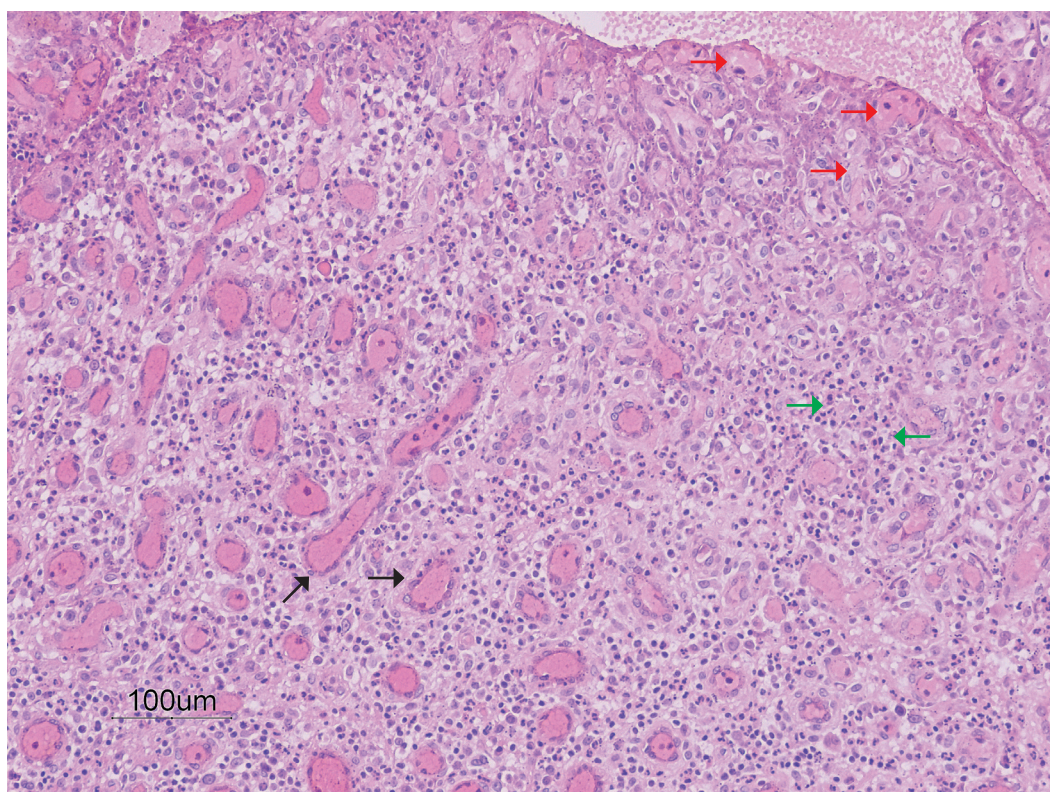


Figura 4 – Imagem de microscopia de luz de lesão periapical crônica com infiltrado inflamatório (setas verdes), histiócitos (setas vermelhas) e vasos sanguíneos (setas pretas).

### 2.1.3. Resposta humoral

Nas lesões periapicais foram também demonstradas células produtoras de imunoglobulinas (Ig), sendo as células positivas para a IgG as mais proeminentes (70%), seguidas das IgA (14%), IgE (10%) e IgM (4%) (Stern *et al.* 1981). Pelo menos uma parte destes anticorpos produzidos localmente são reactivos com os microrganismos infectantes. Além disso, foram demonstradas respostas de anticorpos sistémicos ao LPS e a outras toxinas bacterianas (Dahlen *et al.* 1982b). Estas observações sugerem que quer os anticorpos antibacterianos produzidos localmente quer os sistémicos podem proteger o periápice contra a invasão bacteriana, via opsonização ou lise mediada pelo sistema do complemento. A presença de mastócitos associados a IgE sugere que podem ocorrer reacções de hipersensibilidade do tipo I, anafiláticas, a nível periapical (Marton e Kiss 1993).

As alterações patológicas dos tecidos periapicais são mediadas por respostas imunes específicas e por reacções inflamatórias não específicas (Ninomiya *et al.* 1997). Na interacção com os microrganismos ou com os seus produtos metabólicos são libertados vários mediadores pró-inflamatórios como os neuropeptídeos, as aminas vasoactivas, as cininas, os componentes do sistema do complemento, os metabólitos do ácido araquidónico e as citocinas (Kawashima 2008).

Os neuropeptídeos são compostos libertados pelas células nervosas, com capacidade de modular a resposta inflamatória, envolvidos no processo designado de inflamação neurogénica. Esta resposta inclui o aumento do fluxo sanguíneo, o extravasamento de plasma, e a acumulação de leucócitos, com a consequente promoção da sobrevivência do tecido pelo aumento da perfusão, remoção de materiais nocivos e a quimiotaxia de células fagocitárias aos locais da infecção. Os nervos dentários sensitivos expressam vários neuropeptídeos periféricos, designadamente, a substância P, o “Calcitonin Gene Related Protein” (CGRP) e a neurocinina A. O neuropeptídeo Y e o peptídeo intestinal vasoactivo (VIP) são expressos respectivamente pelas fibras do sistema nervoso simpático e parassimpático. Os neuropeptídeos são sintetizados no corpo celular dos nervos do gânglio trigémio e transportados para a periferia pelo fluxo axonal, onde são armazenados nos ramos nervosos terminais. Em resposta a estímulos eléctricos, mecânicos, químicos ou imunológicos os neuropeptídeos são libertados para os tecidos periapicais via reflexo axonal. Os neuropeptídeos substância P, CGRP, e VIP estimulam um aumento da vasodilatação e encontram-se em concentrações elevadas nos locais de inflamação (Stashenko 1998).

## **2.2. Antibioterapia sistémica**

A utilização de antibióticos por via sistémica não faz parte do tratamento de rotina da periodontite apical, pelo contrário, devem apenas ser utilizados em situações muito pontuais. A minimização dos riscos de sintomas pós-operatórios foi um dos argumentos para a prescrição de antibióticos durante o tratamento endodôntico, porém, os estudos comparativos não provaram a eficácia desta estratégia na diminuição de “flare-up”, dor ou outras complicações agudas (Fouad 2002).

Actualmente existe um consenso generalizado em relação ao facto da utilização de antibióticos, como complemento do tratamento endodôntico, estar limitada apenas a pacientes cuja patologia sistémica assim o exija. Esta deve ser realizada de acordo com as linhas de orientação estabelecidas pelas entidades competentes (Wilson *et al.* 2007).

A sua utilização está indicada também quando existem sinais da infecção se estar a propagar aos tecidos adjacentes, febre, ou ainda, no caso do sistema

imunitário do paciente se encontrar deprimido. Todavia, a resolução de infecções endodônticas deve sempre centrar-se em medidas antimicrobianas locais como: a preparação biomecânica, a antissépsia intracanal ou ainda a drenagem.

É fundamental o uso clínico prudente e apropriado dos antibióticos para prevenir o desenvolvimento de resistências bacterianas. Por isso deve estar reservado para a resolução de infecções activas, em indivíduos saudáveis, ou para prevenção da disseminação das mesmas, em pacientes de alto risco (ADA 2004).

### **2.3. Preparação biomecânica**

A preparação biomecânica compreende a utilização de instrumentos e soluções de irrigação, tendo como objectivos:

- 1) Eliminar completamente os restos de tecido pulpar;
- 2) Remover a dentina contaminada e as bactérias dos canais infectados;
- 3) Alisar as paredes do canal radicular e,
- 4) Dar forma circular ao terço apical do canal, de modo a produzir uma matriz e favorecer a adaptação do material de núcleo no limite cimento-dentina-canal, controlando assim, a possibilidade de extravasamento de cimento endodôntico para os tecidos periapicais (Paulo 1994).

#### **2.3.1. Instrumentação**

A instrumentação é um dos métodos preconizados para o desbridamento, a remoção de tecido necrosado, detritos e bactérias do interior do canal radicular. Adicionalmente, permite a conformação do canal para uma geometria cónica, facilitando assim a limpeza e antissépsia da região apical, além de preservar o *foramen* apical da sobreinstrumentação e de melhorar as condições para a realização da obturação canal.

A eficácia da instrumentação na redução da carga microbiana do canal foi avaliada por Byström e Sundqvist, em 1981. A amostra envolveu 15 dentes necrosados com sinais de periodontite apical, nos quais as culturas microbiológicas realizadas antes do início do tratamento revelaram a presença de um número de células bacterianas entre  $10^2$  até mais de  $10^8$ . O tratamento foi realizado com uma abordagem em múltiplas sessões, num total de 5, nas quais a instrumentação foi realizada com limas manuais de aço-inoxidável e a irrigação com 6 a 10 ml de

soro fisiológico. No final de cada consulta foram colhidas amostras do interior do canal, cultivadas e efectuadas contagens do número de colónias. Esta metodologia de tratamento permitiu a redução do número inicial de bactérias entre 100 a 1000 vezes após a primeira consulta. No entanto, a repetição da instrumentação em consultas sucessivas não possibilitou a eliminação das bactérias do canal, a não ser em casos cuja carga inicial era mais baixa. Não foi também possível associar os casos de infecção persistente com microrganismos específicos. Além disso, a instrumentação repetida em várias sessões de tratamento não pode ser encarada como uma alternativa adequada em termos de custo-benefício ou eficácia na eliminação da infecção canalar (Byström e Sundqvist 1981). Observações semelhantes foram também publicadas por Ørstavik (Ørstavik *et al.* 1991).

Estes estudos demonstraram que a instrumentação, aliada apenas ao soro fisiológico, não atinge os objectivos desejados para a preparação do sistema canalar. Por conseguinte, houve necessidade de trilhar novos caminhos na procura de alternativas mais adequadas, sendo um deles a associação de soluções de irrigação, com elevado poder antisséptico, durante todo o processo de instrumentação do canal. Outras vias estudadas e aplicadas na clínica foram o desenvolvimento de instrumentos mecanizados, em liga de níquel/titânio, e a utilização de energia sónica e ultrassónica para auxiliar a acção dos instrumentos manuais.

### 2.3.2. Irrigação

A irrigação do sistema de canais radiculares, antes, durante e após a instrumentação, apresenta como principais benefícios para a preparação biomecânica, o refluxo de detritos soltos no canal, a dissolução da matéria orgânica, a destruição de microrganismos, a inactivação de endotoxinas, a lubrificação e a limpeza de áreas inacessíveis aos instrumentos, assim como a remoção da "smear layer" (Abou-Rass e Patonai 1982; Chow 1983; Becker e Woollard 2001).

O fluxo de irrigantes com direcção apico-coronária é importante para a remoção de restos de tecido necrótico, raspas de dentina, detritos e bactérias, que de outro modo seriam acumulados e compactados na zona apical durante a fase de instrumentação (Siqueira *et al.* 1997a; Hsieh *et al.* 2007).

A eficácia das soluções de irrigação é influenciada por variáveis como a sua constituição química (Delany *et al.* 1982), a temperatura (Sirtes *et al.* 2005), a tensão superficial (Abou-Rass e Patonai 1982), o volume utilizado (van der

Sluis *et al.* 2006), o tipo e o tamanho da agulha (Chow 1983), a velocidade de saída do irrigante e a posição da agulha (Becker e Woollard 2001), bem como pela configuração anatômica e o comprimento do canal (Hsieh *et al.* 2007). Este último estudo demonstrou que a capacidade dos irrigantes alcançarem a zona apical depende da morfologia do canal, do diâmetro da agulha de irrigação e da distância a que esta se encontra do *foramen* apical. Quanto mais estreito for o canal, menor diâmetro e maior profundidade de penetração da agulha serão necessários para se atingir o *foramen* e conseguir o refluxo da solução em direcção coronária. Em termos práticos, para um canal com alargamento apical 30, é necessário a introdução de uma agulha de calibre 27G, a 3 milímetros do *foramen*, para conseguir uma irrigação eficaz de todo o canal. Por outro lado, em canais muito amplos, preparados até ao tamanho 80, formam-se correntes de turbulência, que podem dificultar a remoção dos detritos. Os autores consideram também que o modelo de túnel de vento é uma mais valia no estudo da hidrodinâmica da irrigação. Nesta concepção, a velocidade de injeção, a viscosidade do líquido, a rugosidade das paredes do canal, o ângulo e a posição do bisel da agulha, bem como a curvatura da raiz, influenciam de forma decisiva a movimentação da solução no interior do canal (Hsieh *et al.* 2007).

Estes parâmetros devem ser tidos em conta, uma vez que uma atitude demasiado prudente pode impossibilitar o fluxo adequado da solução, enquanto que a posição inversa, pode predispôr à ocorrência de acidentes, como, por exemplo, a extrusão de soluções com elevada toxicidade ou detritos para os tecidos periapicais (Hulsmann e Hahn 2000).

As soluções de irrigação mais frequentemente utilizadas em Endodontia são o hipoclorito de sódio (NaOCl), o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e a clorhexidina (CHX).

O hipoclorito de sódio é o composto mais amplamente usado na irrigação canalar e as concentrações recomendadas variam desde 0,5% (soluto de Dakin), a 1% (soluto de Milton) ou mesmo até aos 5,25%.

Em solução aquosa o hipoclorito de sódio sofre uma reacção ácido-base, na qual coexistem em equilíbrio os reagentes e os produtos da reacção, hidróxido de sódio (NaOH) e ácido hipocloroso (HOCl). Este último ioniza-se originando hidrogénios ( $H^+$ ) e hipoclorito ( $OCl^-$ ), o qual contém cloro activo, um forte agente oxidante que exerce o seu efeito antibacteriano pela oxidação irreversível dos grupos sulfidril de enzimas bacterianas essenciais, interferindo, deste modo, com as suas actividades metabólicas ou membranares (Pécora 2004).



Na sequência de estudos realizados por Byström e Sundqvist, para avaliar a eficácia antibacteriana de diferentes abordagens no tratamento de dentes necrosados com periodontite apical, foi clinicamente testado o efeito da irrigação com hipoclorito de sódio a 0,5% e comparado com os resultados obtidos com soro fisiológico. Um total de 15 dentes foram instrumentados e irrigados ao longo de 5 sessões, intervaladas de 2 a 4 dias, sem qualquer medicação intracanal entre as consultas. No início do estudo e no final de cada sessão foram realizadas colheitas para estudo bacteriológico. Todas as amostras iniciais evidenciaram crescimento bacteriano. O número de espécies isoladas foi proporcional à quantidade de células bacterianas inicialmente presentes no canal; nos canais com carga bacteriana inferior a  $10^5$  apenas foram identificadas duas espécies, enquanto que para quantidades superiores foram identificadas até oito espécies distintas no mesmo canal. A flora bacteriana isolada era majoritariamente composta por anaeróbios. Após as 5 consultas, 12 dos 15 dentes não apresentaram cultura bacteriológica positiva, o que representa uma melhoria quando comparado com a irrigação com soro fisiológico, onde apenas 8 dos 15 canais evidenciaram ausência de crescimento bacteriano. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio a 0,5% é um irrigante com uma eficácia antibacteriana clínica superior ao soro fisiológico (Byström e Sundqvist 1983).

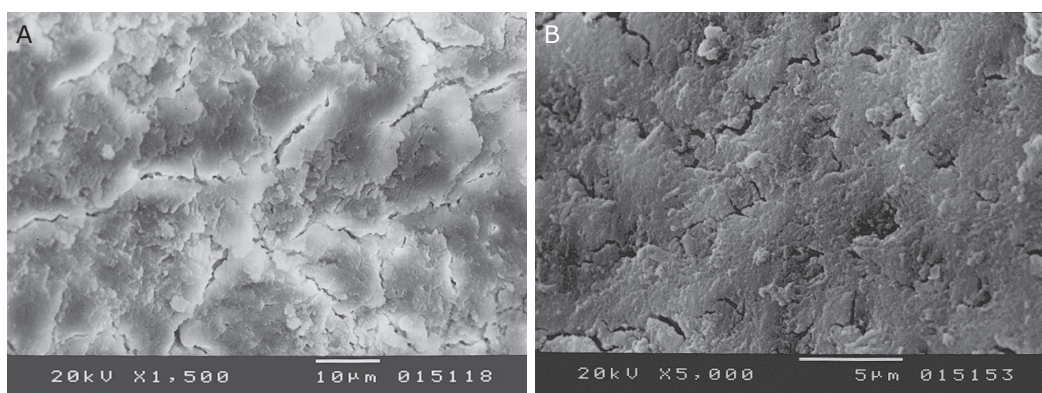
Noutro estudo do mesmo grupo de investigadores, foi comparada a eficácia clínica da irrigação com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações: a 0,5%, a 5% e a 5% intercalado com EDTA. Em 3 grupos de 20 dentes necrosados, com periodontite apical, foram testados os diferentes protocolos e os resultados avaliados por métodos bacteriológicos. Ao fim de 3 sessões de tratamento, intervaladas de 2 a 4 dias, o estudo não detectou diferenças entre a capacidade antibacteriana do hipoclorito a 0,5 ou a 5%, mas revelou uma maior eficácia da combinação de EDTA com hipoclorito de sódio a 5%. Este facto pode ser atribuído à capacidade de o EDTA eliminar a "smear-layer" e facilitar a acção do hipoclorito na parede canal e nos túbulos dentinários. Os autores salientaram ainda que as bactérias resistentes à instrumentação e irrigação, cresceram rapidamente no interior do canal quando o mesmo ficou vazio (sem qualquer medicação) entre consultas (Byström e Sundqvist 1985).

O aumento da concentração da solução de hipoclorito promove uma melhoria da sua capacidade de dissolver os restos pulpaes e componentes orgânicos, todavia incrementa substancialmente a toxicidade tecidual (Pashley *et al.* 1985). Um dos métodos para otimizar a eficácia clínica de concentrações mais baixas de hipoclorito consiste em realizar o pré-aquecimento da solução

(Cunningham e Balekjian 1980; Sirtes *et al.* 2005). Contudo, há que ter em consideração que à medida que reage com a matéria orgânica presente no canal, o hipoclorito vai sendo inativado, com conseqüente diminuição da sua capacidade antimicrobiana. A renovação periódica da solução, ou seja, o aumento do volume de irrigação, é outra forma de aumentar a eficácia sem comprometer a segurança (Moorer e Wesselink 1982). Além disso, também foi demonstrado que a agitação da solução com ultrassons (Carver *et al.* 2007) e um tempo de contacto mais longo aumentam a sua capacidade solvente (D'Arcangelo *et al.* 2007).

O ácido etilenodiaminotetracético é um agente quelante, utilizado na clínica sob a forma de solução aquosa ou em suspensão viscosa, habitualmente em concentrações a rondar os 17%. Tem também propriedades lubrificantes e emulsionantes, mas a sua capacidade antimicrobiana é muito reduzida (Siqueira *et al.* 1998a). Foi introduzido na Endodoncia para ajudar na preparação de canais atrésicos, devido à sua capacidade de fixar o cálcio e assim facilitar a instrumentação da dentina.

Importa aqui referir que durante a instrumentação do canal produz-se uma camada de resíduos que fica a recobrir as paredes de dentina. Esta camada, designada "smear layer", é composta por uma parte inorgânica e outra orgânica, que inclui restos dos processos odontoblásticos, de tecido necrótico e microrganismos (Figuras 5A e 5B). Uma parte da mesma encontra-se a recobrir a superfície da parede canal, a "smear on", e tem 1 a 2  $\mu\text{m}$  de espessura; a outra parte penetra e fica compactada no interior dos túbulos dentinários até uma profundidade de cerca de 40  $\mu\text{m}$  e é denominada de "smear in" (Mader *et al.* 1984; Pashley 1984; Torabinejad *et al.* 2002).



Figuras 5A e 5B – Camada de resíduos a recobrir a parede do canal radicular após instrumentação, designada de "smear layer" (MEV).

A reduzida dimensão das partículas que integram a “smear layer”, ou por outra, a elevada relação superfície/massa, fazem com que seja bastante solúvel em ácidos (Pashley 1992). Esta propriedade faz com que ácidos como o EDTA tenham a capacidade de efectuar a sua remoção química (Fig. 6A e 6B). Contudo, foi verificado que quando se usa apenas EDTA, remove-se a parte inorgânica mas deixa-se a parte orgânica da “smear layer” intacta nos túbulos. Para remover a camada orgânica é necessária outra solução solvente que actue sobre o colagénio, como, por exemplo, o hipoclorito de sódio (Baumgartner e Mader 1987). A utilização de um regime de irrigação final alternado com hipoclorito de sódio e solução aquosa de EDTA a 17%, demonstrou a sua eficácia na remoção da “smear layer” em estudos de ultramorfologia (Peters e Barbakow 2000). A utilização de um gel lubrificante, que contenha EDTA na sua composição (Glyde™ File Prep, cujos constituintes são o EDTA e o peróxido de carbamida num veículo hidrossolúvel), durante a fase de preparação canal, associado a irrigação intercalada com hipoclorito de sódio a 1%, também evidenciou capacidade para remover a “smear layer” da superfície da parede canal (Lim *et al.* 2003).

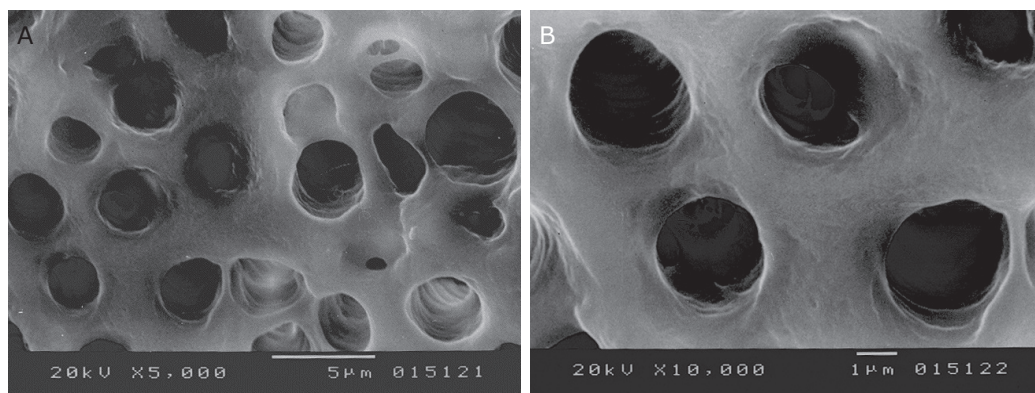


Figura 6A e 6B – Imagens da parede do canal após irrigação com hipoclorito de sódio a 2,6%, seguida de EDTA a 17% durante 1 minuto e neutralização final com soro fisiológico. Destacamos a ausência de “smear layer” e os túbulos dentinários abertos (MEV).

Estudos recentes demonstram que a reacção entre o EDTA e o hipoclorito de sódio conduz a uma diminuição dos iões cloreto livres, o que pode diminuir a eficácia antimicrobiana deste último (Zehnder 2006). Zehnder e colaboradores avaliaram a interacção da mistura de hipoclorito de sódio com diversos agentes quelantes, concluindo que o EDTA, o ácido cítrico e o trifosfato de sódio redu-



zem substancialmente a quantidade de iões cloreto livres em solução. Sugerem como alternativa o uso de 1-hidroxietileno-1-bifosfonato (HEPB) que, de todos os quelantes estudados, foi o único que não interferiu com a capacidade antimicrobiana do hipoclorito (Zehnder *et al.* 2005)

Apesar da controvérsia em relação ao efeito da presença de “smear layer” na qualidade da instrumentação e obturação, vários investigadores demonstraram que esta camada pode conter em si mesma microrganismos e, além disso, proteger bactérias, já anteriormente presentes no interior dos túbulos dentinários, da acção antisséptica dos irrigantes (Brannstrom 1984; Pashley 1984; Yoshida *et al.* 1995). Tendo em consideração estes aspectos, parece prudente promover a sua remoção durante a instrumentação de canais infectados de modo a facilitar a penetração de irrigantes no interior dos túbulos dentinários. Não obstante, ainda não se encontra clarificado se esta camada deve ser definitivamente removida, dado existirem estudos que demonstram que a sua presença pode inibir a penetração de novas bactérias nos túbulos, após a desinfecção. Por conseguinte, existem autores que defendem a sua remoção durante a instrumentação, de modo a permitir uma melhor desinfecção, mas preconizam que uma nova “smear layer” deve ser criada antes da obturação, para prevenir a reinfecção (Love *et al.* 1996).

A clorohexidina (CHX) é um agente antimicrobiano eficaz contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Apresenta como principais vantagens o espectro de acção, a substantividade e a baixa citotoxicidade. Tem, no entanto, inconvenientes como sejam, a redução de actividade na presença de matéria orgânica, a dependência do pH para actuar em condições óptimas e a falta de capacidade para dissolver matéria orgânica (Ringel *et al.* 1982).

Apesar de produzirem alguns resultados conflituosos, os estudos comparativos entre a capacidade antimicrobiana da CHX e do hipoclorito, demonstram, na sua maioria, que quando usados em concentrações idênticas, os seus efeitos no canal e na dentina infectada são semelhantes (Vahdaty *et al.* 1993; Jeansonne e White 1994; Heling e Chandler 1998; Ercan *et al.* 2004).

No entanto, um estudo *in vitro*, realizado por Gomes e colaboradores, demonstrou uma diferença significativa entre a capacidade do NaOCl e da CHX eliminarem *Enterococcus*. Apesar de ambas as soluções serem eficazes nas concentrações estudadas (NaOCl a 0,5%, 1%, 2,5%, 4%, 5,25%, e CHX a 0,2%, 1% e 2% na forma de gel e líquido), o tempo necessário para destruir o *Enterococcus faecalis* foi substancialmente diferente. A CHX a 0,2%, na forma

líquida, foi eficaz ao fim de 30 segundos, enquanto que o NaOCl apenas atingiu resultados semelhantes na sua máxima concentração (5,25%), necessitando as concentrações mais baixas de uma exposição mais prolongada (entre 5 a 30 minutos) (Gomes *et al.* 2001). Estes resultados foram corroborados por outro estudo, no qual se constatou *in vitro*, superioridade da CHX em relação ao NaOCl na eliminação de *E. faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Outro aspecto relevante foi a maior rapidez de acção da solução líquida de CHX relativamente ao gel, quando comparadas iguais concentrações (Vianna *et al.* 2004).

Apesar de vários estudos demonstrarem a capacidade da CHX eliminar o *E. faecalis*, *in vitro*, devemos ter em conta que nenhum estudo clínico demonstrou ainda a sua superioridade na eliminação desta estirpe.

O facto de nenhuma das soluções de irrigação conhecidas congregar todas as propriedades desejadas tem impulsionado a pesquisa de associações que permitam uma sinergia de efeitos de vários compostos.

O modelo de infecção de túbulos dentinários com *E. faecalis*, *in vitro*, tem sido amplamente usado para testar a eficácia de diferentes soluções de irrigação e suas combinações. Siqueira e colaboradores estudaram neste modelo a associação entre o NaOCl e o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), não encontrando diferença relativamente ao NaOCl utilizado isoladamente (Siqueira *et al.* 1997b). Outra associação estudada, a de CHX com  $H_2O_2$  a 3%, no mesmo modelo, demonstrou superioridade quando comparada com os mesmos irrigantes usados de forma independente (Heling e Chandler 1998).

Entretanto, foi recentemente desenvolvida e comercializada uma nova solução de irrigação, o Biopure™ MTAD® (Tulsa Dentsply). Este produto é composto por uma mistura de doxiciclina (D), ácido cítrico (A) e um detergente, o “Twe-en-80” (T). Esta solução tem sido sugerida como irrigação final pré-obturação devido à sua capacidade de remover a “smear layer” (Torabinejad *et al.* 2003) e às suas superiores propriedades antimicrobianas, nomeadamente contra o *E. faecalis* (Shabahang e Torabinejad 2003; Portenier *et al.* 2006; Davis *et al.* 2007; Royal *et al.* 2007).

## 2.4. Medicação intracanal

Alguns estudos clínicos realizados em dentes com diagnóstico de periodontite apical demonstraram que a instrumentação e a irrigação com soluções

antissépticas (preparação biomecânica), conseguem, numa única sessão, diminuir a presença de bactérias no interior dos canais até níveis não detectáveis por métodos microbiológicos modernos, em 60% (Sjögren *et al.* 1997) a 66% (Peters e Wesselink 2002) dos casos. A aplicação adicional de uma solução iodada, durante 10 minutos, após a preparação, permitiu reduzir a presença de bactérias a um nível não detectável em 71% dos casos (Kvist *et al.* 2004). Contudo, até mesmo os canais com cultura positiva evidenciaram uma redução acentuada da quantidade de bactérias presentes no seu interior, o que revela a eficácia clínica da preparação biomecânica, cuidadosamente realizada, no combate da infecção intracanal. Ainda assim, após alcançada esta etapa, desde que haja espaço e nutrientes disponíveis, a população microbiana do canal pode crescer e atingir uma quantidade igual ou superior à existente antes do início da preparação (Sjögren *et al.* 1991).

À partida, existem duas possibilidades para manter inócuos os baixos níveis de carga microbiana obtidos após a preparação biomecânica. Fomentando a eliminação adicional de microrganismos antes da obturação, através da utilização de medicação intracanal antisséptica entre sessões de tratamento, ou realizando a obturação canal na mesma sessão, beneficiando das propriedades antimicrobianas dos cimentos endônticos em presa e da eliminação de microrganismos residuais pelo seu aprisionamento ou pelo bloqueio da chegada de nutrientes até eles (Peters 2002; Peters e Wesselink 2002; Molander *et al.* 2007; Penesis *et al.* 2008).

A escolha de cada uma destas abordagens é, no entanto, complexa e controversa. Para ajudar a clarificar este assunto convém analisar de forma independente o tratamento de duas situações clínicas. Ou seja, por um lado, o tratamento de dentes vitais ou necrosados, sem sinais radiográficos de lesão apical; por outro o tratamento de dentes com evidência radiográfica de periodontite apical. No primeiro caso, entende-se que a medicação intracanal entre sessões não é uma necessidade primordial, pois a inexistência de microrganismos na polpa, ou a sua baixa quantidade e virulência, fazem com que a diminuição da população microbiana atingida pela preparação biomecânica seja suficiente para alcançar o sucesso terapêutico (Chugal *et al.* 2001; Spangberg 2001). Não obstante, as limitações de tempo, a complexidade anatômica, a existência de reabsorção externa, a presença de hemorragia ou exsudato no canal podem determinar a necessidade de consultas adicionais e o recurso à medicação intracanal. A questão torna-se ainda mais complexa no tratamento

de dentes com periodontite apical. Os estudos clássicos mostraram que, perante esta patologia, o clínico tem de enfrentar microrganismos em quantidades substanciais e dotados de avançados factores de virulência, pelo que se advogou recorrer à utilização de medicação intracanal para ajudar a erradicar os microrganismos que sobreviveram à instrumentação e irrigação (Byström *et al.* 1985; Sjögren *et al.* 1991). No entanto, estudos clínicos recentes demonstram que a redução da carga microbiana alcançada com duas ou mais sessões não é superior ao que se consegue no final da primeira (Shuping *et al.* 2000; Peters *et al.* 2002a; Kvist *et al.* 2004). Além disso, os ensaios clínicos prospectivos existentes não mostram diferenças estatisticamente significativas nas taxas de sucesso atingidas com o tratamento em uma ou em múltiplas sessões (Trope *et al.* 1999; Weiger *et al.* 2000). Uma revisão sistemática e meta-análise recente, cuja questão clínica foi realizada seguindo a metodologia "PICO" (P=problema; I=intervenção; C=comparação; O= objectivo esperado), avaliou em que medida é que a medicação intracanal com hidróxido de cálcio consegue eliminar bactérias residuais presentes nos canais, após terminar a preparação biomecânica, utilizando como indicador o número de culturas positivas pré e pós-medicação. Os critérios de inclusão usados no estudo foram: pacientes não portadores de patologia sistémica, todos os dentes com lesões periapicais radiograficamente visíveis antes do tratamento, periodontite apical primária e realização de culturas em aerobiose e em anaerobiose. Além disso, os estudos incluídos nesta revisão apresentavam resultados das culturas dos canais em 3 estádios, a saber, antes do desbridamento (S1), após terminar a preparação biomecânica do canal (S2), e, finalmente, no momento da segunda consulta, após a medicação intracanal ser removida (S3). No final apenas 8 estudos preencheram os critérios de inclusão, com amostras entre os 18 e os 60 casos tratados, permitindo um número final de 257 canais em estudo. Verificou-se uma grande heterogeneidade de resultados entre os vários estudos e a meta-análise realizada não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os resultados das culturas pré e pós-medicação. Os autores concluem que, com base na melhor evidência científica disponível, o hidróxido de cálcio tem uma eficácia muito limitada na eliminação de bactérias do canal radicular, pelo que se devem procurar alternativas mais válidas para este fim (Sathorn *et al.* 2007).

Contudo, na prática clínica diária, a presença de sinais de infecção, a complexidade anatómica, a falta de tempo e as outras razões indicadas para dentes sem periodontite apical, bem como o receio de enfrentar uma situação de "fla-

re-up” após obturação definitiva do canal, tornam a opção de tratamento em duas ou mais sessões numa alternativa à qual uma elevada percentagem de profissionais ainda hoje continua a recorrer (Gatewood *et al.* 1990; Inamoto *et al.* 2002).

Ao longo dos tempos foram propostos e utilizados como medicação canalicular entre consultas diversos produtos químicos, tais como: fenóis, aldeídos, antibióticos, esteróides, produtos iodados, pasta de hidróxido de cálcio, clorhexidina ou combinações destes produtos. Pela sua actualidade e relevância iremos desenvolver apenas os dois últimos.

#### 2.4.1. Hidróxido de cálcio

O hidróxido de cálcio é uma substância fortemente alcalina, de baixa solubilidade, com um pH de cerca de 12,5. Em solução aquosa dissocia-se em iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), sendo os últimos responsáveis pelo ambiente alcalino e pela acção antibacteriana. Os iões hidroxilo são radicais livres de elevada reactividade, capazes de se ligarem a diversas biomoléculas. Os seus efeitos letais podem resultar dos seguintes mecanismos: a) lesão da membrana citoplasmática bacteriana; b) desnaturação de proteínas; ou c) alteração do DNA (Siqueira e Lopes 1999).

Além da sua actividade antimicrobiana, o hidróxido de cálcio revelou capacidade de dissolver matéria orgânica (Andersen *et al.* 1992), neutralizar o lipopolissacarídeo bacteriano (Safavi e Nichols 1993; Tanomaru *et al.* 2003) e inibir os processos de reabsorção radicular (Cvek 1992; Caliskan e Sen 1996).

O LPS é uma endotoxina produzida pelas bactérias Gram-negativas e constitui um factor de virulência relevante na etiologia das lesões pulpares e periapicais. A porção lipídica do LPS, o lipídeo A, é a responsável pelas suas actividades biológicas. Foi demonstrado que o hidróxido de cálcio pode hidrolisar o lipídeo A, destruindo as ligações éster dentro da molécula de LPS e promovendo assim a libertação de ácidos gordos hidroxilados, com consequente inactivação dos seus efeitos tóxicos (Safavi e Nichols 1993).

É possível concentrar uma quantidade relativamente grande de hidróxido de cálcio no interior do sistema de canais radiculares, com pequeno risco de irritação periapical, o que permite a mobilização de iões hidroxilo por períodos prolongados. Esta particularidade permite uma eficácia bactericida e uma dura-

ção de acção superior aos clássicos derivados fenólicos e aldeídos, com níveis de toxicidade muito mais baixos (Messer e Chen 1984; Fager e Messer 1986).

Permanecendo durante alguns dias no interior dos canais radiculares, o hidróxido de cálcio desenvolve um gradiente de difusão de iões hidroxilo, chegando rapidamente à dentina radicular interna (pico às 24h com pH=10,8). Contudo, leva 3 a 7 dias a chegar até à junção cimento dentinária e 2 a 3 semanas até atingir o seu pico (pH=9)(Nerwich *et al.* 1993). A velocidade de difusão destes iões depende da permeabilidade dentinária (densidade e diâmetro dos túbulos), bem como da capacidade tampão da dentina, derivada da presença de iões fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) na porção hidratada da hidroxiapatite (Wang e Hume 1988; Nerwich *et al.* 1993).

O pH do meio exerce uma pressão selectiva enorme sobre os microrganismos e apenas os que possuem mecanismos de adaptação conseguem sobreviver. A maioria das proteínas e outras moléculas biologicamente relevantes têm estabilidade e actividade óptima numa faixa de pH estreita, em torno da neutralidade. No entanto, a maioria das bactérias apresentam tolerância a variações do pH e crescem facilmente com valores compreendidos entre 6 e 9. Esta capacidade de adaptação depende da activação de sistemas enzimáticos específicos, da bomba de protões e de sistemas tampão que ajudam a manter o pH citoplasmático praticamente constante. Além destes mecanismos, alguns produtos elaborados durante o crescimento bacteriano podem também ajudar a neutralizar o pH do meio (Siqueira e Lopes 1999).

Alguns microrganismos da flora canalar, nomeadamente o *E. faecalis* e a *C. albicans*, têm demonstrado resistência e capacidade de sobrevivência mesmo com níveis de pH acima de 11 (Waltimo *et al.* 1999; Evans *et al.* 2002).

O tempo mínimo necessário para a actuação do hidróxido de cálcio nos canais ainda permanece desconhecido, pois os ensaios clínicos com recurso a técnicas microbiológicas produziram resultados difíceis de interpretar. Byström e colaboradores verificaram que um mês de permanência no canal permitia eliminar as bactérias em todos os casos em que utilizaram medicação intracanal com  $\text{Ca(OH)}_2$  (Byström *et al.* 1985). Reit e Dählen, estudaram a aplicação durante um período de 2 semanas e, no final, encontraram bactérias em 26% dos canais (Reit e Dahlen 1988). Sjögren e colaboradores testaram o período de uma semana e observaram que 100% dos canais se encontravam livres de bactérias cultiváveis (Sjögren *et al.* 1991). Já Ørstavik e colaboradores, com a mesma duração de aplicação, verificaram a presença de bactérias em 34% dos

canais (Ørstavik *et al.* 1991). E, por fim, Barbosa e colaboradores, ao avaliarem o mesmo período, constataram que 27% dos canais ainda apresentavam culturas positivas (Barbosa *et al.* 1997).

Como foi anteriormente referido, a acção do hidróxido de cálcio é altamente dependente do pH induzido no meio pelos iões  $\text{OH}^-$  e tem de exercer os seus efeitos no interior do canal radicular rodeado por dentina e eventualmente por exsudatos periapicais, ambos portadores de moléculas com capacidade tampão, passíveis de promover a descida dos níveis de pH. Portenier e colaboradores demonstraram que na presença de albumina de soro bovino a 18% (massa/volume), o hidróxido de cálcio é ineficaz contra o crescimento do *E. faecalis* (Portenier *et al.* 2001). Além disso, estudos recentes têm destacado o papel da bomba de protões como mecanismo que permite a homeostasia do pH intracitoplasmático capaz de conferir resistência bacteriana ao meio alcalino (Booth 1985; Evans *et al.* 2002). As limitações encontradas para o desempenho da acção antimicrobiana do hidróxido de cálcio fomentaram a procura de novos compostos para utilização intracanal.

#### 2.4.2. Clorohexidina (CHX)

A identificação de espécies de microrganismos resistentes ao efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio e o isolamento frequente dos mesmos em casos de insucesso de tratamento, impulsionaram a pesquisa de compostos antissépticos alternativos (Waltimo *et al.* 1999; Peciulienė *et al.* 2001; Pinheiro *et al.* 2003; Siqueira e Roças 2004; Portenier *et al.* 2005).

A clorohexidina surgiu no decurso de estudos para o desenvolvimento de agentes antivirais tendo fraca actividade nesta aplicação, mas posteriormente revelou-se um excelente agente antimicrobiano de largo espectro. É eficaz contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Nas bactérias o seu mecanismo de acção envolve a permeabilização da parede celular causando a perda dos componentes intracelulares. Nos fungos actua por agressão da membrana plasmática externa e permeabilização da membrana interna. Em altas concentrações causa precipitação e coagulação dos constituintes intracelulares (McDonnell e Russell 1999).

Quimicamente é uma bisguanida catiónica, composta estruturalmente por dois anéis clorofenólicos nas extremidades, ligados a um agrupamento biguanida de cada lado por uma cadeia central de hexametileno.

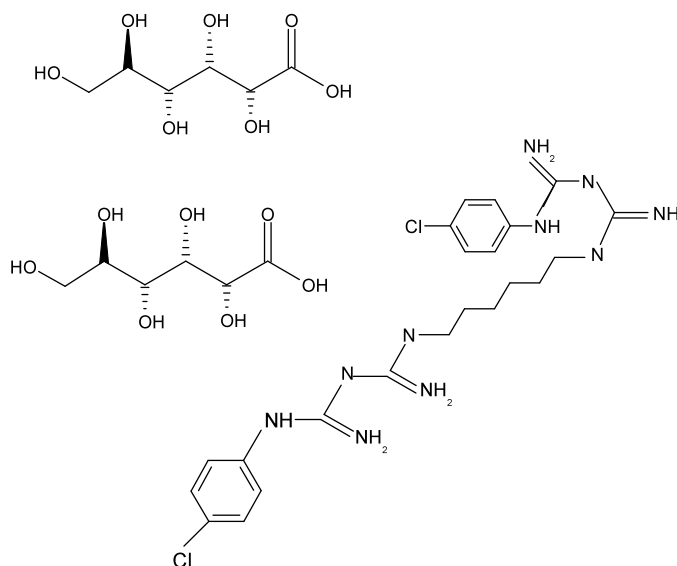


Figura 7 – Fórmula química do digluconato de clorohexidina.

Devido à sua baixa solubilidade tem sido utilizada em medicina dentária na forma de sal de digluconato, de modo a proporcionar uma melhor solubilidade em água (Delany *et al.* 1982). A solução aquosa é mais estável em pH de 5 a 8. Acima deste valor ocorre precipitação, enquanto que em pH mais ácido constata-se uma diminuição da sua actividade. Em pH fisiológico, esta substância exerce excelente actividade antimicrobiana, dissociando-se e libertando moléculas com carga positiva (Parsons *et al.* 1980).

O digluconato de clorohexidina é normalmente utilizado em medicina dentária em concentrações que variam dos 0,12% aos 2% e a toxicidade tecidual apresentada por estas concentrações é muito baixa (Jeansonne e White 1994). Tendo em conta o seu uso generalizado como desinfectante durante a lavagem das mãos e antisséptico oral, os casos descritos de alergia podem ser considerados raros na população em geral (Okano *et al.* 1989; Garvey *et al.* 2001).

O espectro antimicrobiano inclui a maioria dos microrganismos orais associados ao desenvolvimento de periodontite apical (Emilson 1977). Um aspecto específico de interesse prende-se com a sua capacidade de eliminar microrganismos que não são facilmente afectados pela medicação intracanal convencional, como o *E. faecalis* (Sundqvist *et al.* 1998; Zoletti *et al.* 2006) ou a *C. albicans* (Waltimo *et al.* 1997). Estes microrganismos apresentam resistência ao  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  mas evidenciam susceptibilidade à CHX (Ørstavik e Haapasalo 1990; Basrani *et al.* 2003).



A substantividade antimicrobiana é uma particularidade da CHX que a torna ainda mais apelativa como medicação intracanal. Esta propriedade resulta da sua capacidade para se ligar à hidroxiapatite e a grupos aniónicos das glicoproteínas, sendo depois gradualmente libertada, à medida que a sua concentração no meio diminui, conferindo assim uma actividade antimicrobiana prolongada no tempo. Para se atingir a substantividade antimicrobiana, a dentina deve ser exposta às moléculas de CHX por um período de tempo superior ao que ocorre durante a irrigação canal. Foi demonstrado que o período de uma semana é efectivo na indução de substantividade na dentina radicular (Komorowski *et al.* 2000; Lenet *et al.* 2000; Basrani *et al.* 2002).

A avaliação *in vitro* da substantividade antibacteriana, induzida na dentina, produziu provas científicas de que esta actividade se mantém por períodos desde 48 horas (Schafer e Bossmann 2005), 72 horas (Siren *et al.* 2004), pelo menos 21 dias (Lenet *et al.* 2000; Basrani *et al.* 2002), ou mesmo, até 12 semanas após ser removida do canal (Rosenthal *et al.* 2004).

A CHX pode ser utilizada sob a forma de líquido, gel ou com recurso a fibras de polímeros para libertação gradual no canal (Huang *et al.* 2000; Lenet *et al.* 2000; Lee *et al.* 2005).

#### 2.4.3. Interacção entre o hidróxido de cálcio e clorhexidina

Siren e colaboradores num estudo *in vitro*, no modelo do bloco de dentina, demonstraram superioridade da combinação  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -CHX, em relação ao  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  puro, na erradicação do *E. faecalis* da dentina infectada (Siren *et al.* 2004). Estes resultados foram corroborados por outros estudos com mesmo modelo experimental onde a associação  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -CHX a 2% revelou maior eficácia na erradicação bacteriana (Basrani *et al.* 2003; Evans *et al.* 2003). Destes estudos ressaltam dois benefícios principais que se podem alcançar ao associar o hidróxido de cálcio à CHX. Por um lado a obtenção de uma pasta mais consistente, capaz de actuar como um barreira física à recontaminação do canal radicular, por outro, um alargamento do espectro antimicrobiano.

Contudo, a avaliação da eficácia comparativa do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  puro e das associações  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -CHX a 0,2%, e  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - paramonoclorofenol na eliminação de *E. faecalis*, *in vitro*, revelou a superioridade desta última medicação intracanal em relação às duas primeiras, as quais não apresentaram diferenças entre si (Sukawat e Srisuwan 2002). Os resultados dos estudos *in vitro* não são consis-

tentes no que concerne ao aumento da eficácia antimicrobiana da combinação de hidróxido de cálcio com clorohexidina relativamente ao seu uso isolado ou combinado com outros compostos.

Um ensaio clínico recente demonstrou idêntica actividade antimicrobiana para o  $\text{Ca(OH)}_2$  ou para a combinação de  $\text{Ca(OH)}_2$  com CHX a 2% na eliminação de microrganismos durante o retratamento endodôntico (Zerella *et al.* 2005).

## 2.5. Obturação Canalar

A obturação canalar consiste no preenchimento tridimensional do sistema de canais radiculares dentários, desde a câmara pulpar à junção cementodentinária, utilizando para este efeito materiais adequados (Gutmann 2002; Wesselink 2003).

Os materiais usados com esta finalidade devem ser considerados verdadeiros implantes, dado que estão sediados e em contacto directo ou indirecto com tecidos vitais perirradiculares, via *foramen* apical, canais laterais ou através dos túbulos dentinários (Schmalz 2003).

A sua função principal é prevenir a microinfiltração ao longo do sistema canalar, assegurando um ambiente biologicamente favorável à dinâmica da cicatrização dos tecidos (Sundqvist e Figdor 1998; Gutmann 2002; Schmalz 2003; Carrotte 2004). Ao funcionar como barreira a fluidos e bactérias, a obturação impede a microinfiltração ao longo do canal radicular, impedindo a entrada de microrganismos e protegendo os tecidos perirradiculares da infecção por contaminantes da cavidade oral. Além disso, o aprisionamento dos microrganismos e toxinas que possam resistir à preparação canalar entre o material de obturação e as paredes de dentina, evita a sua migração para os tecidos envolventes, minimizando o risco infeccioso. Acresce que ao proteger o sistema radicular do influxo de exsudatos periapicais, se impede os microrganismos aprisionados de acederem aos nutrientes neles contidos encurtando assim a respectiva sobrevivência (Sundqvist e Figdor 1998; Wesselink 2003).

### 2.5.1. Evolução histórica dos materiais

Antes do séc. XIX apenas existe evidência da utilização do ouro como material de obturação canalar. Todavia, a partir desta data foram utilizados e

descritos diversos materiais com este propósito. Citam-se, entre outros, o cloreto de zinco, o chumbo, as pontas de madeira de laranjeira associadas a uma pasta de iodofórmio e fenol, o cedro associado a parafina, o marfim pulverizado e a dentina de cão e humana (Leal 1998).

Em meados do séc XIX, foi introduzida a guta-percha na Medicina Dentária por José D'Almeida, cirurgião português, e por William Montgomery de Singapura (Infopedia 2007). No entanto, a sua utilização no preenchimento do espaço pulpar foi pela primeira vez anunciada por Bowman, em 1867, após ter realizado a obturação canalar de um dente molar extraído. As pontas de guta-percha começaram a ser manufacturadas, em 1887, pela companhia SS White (Gutmann 2002).

Com a introdução da radiologia na avaliação do tratamento, tornou-se óbvio que as pontas de guta-percha, por si só, seriam incapazes de preencher todo o espaço pulpar. Por isso, no início do séc. XX, procuraram-se formas de moldar os cones e a obturação passou a ser feita com guta-percha plastificada por solventes, como o clorofórmio (cloropercha) ou o eucaliptol (eucapercha). Em 1914, Callahan desenvolveu a técnica de amolecimento e dissolução de guta com resinas, utilizando depois esta pasta como agente cimentante dos cones no canal. A partir desta data houve um reconhecimento, no campo da Endodontia, da importância técnica e biológica da utilização de um agente de ligação entre os cones e a parede de dentina, pelo que foram estudados múltiplos materiais com composição química diversa para esta finalidade (Gutmann 2002; Ørstavik 2005). Contudo, a guta-percha permaneceu ao longo de todo o séc. XX como o principal material de núcleo da obturação, quase exclusivo, tendo sido confrontada durante todo este período apenas com alguns adeptos dos cones de prata (Gutmann 2002; Wesselink 2003; Ørstavik 2005).

Neste novo milénio, a investigação direccionou-se para a procura de materiais de núcleo e de cimentos endodônticos com capacidade de adesão química, entre si, e às paredes de dentina, capazes de formarem um monobloco com a estrutura radicular remanescente. Nesse sentido, surgiram duas estratégias de evolução para um novo paradigma da obturação canalar. Uma das linhas propostas preconiza o uso de cones de guta-percha, revestidos por um polímero, sendo este capaz de fazer a ligação química entre o poliisopreno e um cimento endodôntico à base de resina (Tay *et al.* 2005; Hiraishi *et al.* 2006). A outra alternativa consiste num material de núcleo inteiramente novo nesta área, a policaprolactona, misturada com monómeros de resina, capazes de reagir e de se ligarem quimicamente com o cimento endodôntico, e este último com a dentina radicular (Chivian 2004; Shipper *et al.* 2004).

Por conseguinte, o padrão actual para a obturação canalar consiste na combinação de um material de núcleo central e um cimento endodôntico que preenche o espaço entre o primeiro e a parede de dentina.

### 2.5.2. Materiais de núcleo

Os materiais de núcleo são sólidos ou semi-sólidos e constituem o principal volume do material de obturação. Apresentam-se com formato compatível com os instrumentos de preparação canalar, permitem o controlo radiográfico prévio, asseguram a previsibilidade do nível apical de obturação, e, além disso, conferem a desejada estabilidade dimensional da mesma. Porém, quando estes materiais são utilizados isoladamente, não têm capacidade de prevenir a microinfiltração ao longo do canal, sendo, por isso, necessário a sua associação a um cimento de selamento (Walton 1997; Gutmann 2002; Wesselink 2003).

A guta-percha, os cones de prata, a guta-percha revestida de resina e o Resilon™ são apresentados em seguida.

#### 2.5.2.1. Guta-percha

A guta-percha é uma substância vegetal extraída de árvores da família *Sapotaceae*, do género *Palaquium* e fundamentalmente da espécie *Palaquium gutta*. Estas árvores tropicais são nativas do sudeste asiático, e existem principalmente na Malásia, Sumatra e nas Filipinas.

A palavra “guta-percha” tem origem no malaio “getah percha”, cujo significado de “getah” é goma e “percha” é o nome da própria árvore. A composição química da guta-percha é baseada na molécula do isopreno (2-metil-1,3-butadieno), agrupado sob a forma de polímero (trans-1,4-poliisopreno), também designado de politerpeno (Fig.8). A guta-percha e a borracha natural são polímeros de elevado peso molecular, estruturados a partir da mesma unidade básica, o monómero de isopreno, constituindo um exemplo de isomerismo.

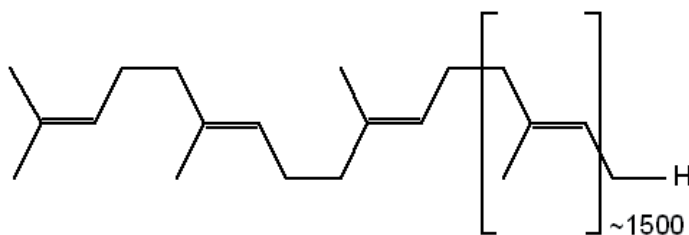


Figura 8 – Fórmula química do poliisopreno.

O *trans*-poliisopreno, possui os grupos  $\text{CH}_2$  em extremidades opostas à ligação dupla, e apresenta três fases distintas: à temperatura ambiente encontra-se na fase beta, surgindo como material sólido, passível de ser compactado ou expandido e não pegajoso; a fase alfa, que surge por volta dos  $60^\circ\text{C}$ , na qual se torna fluida, viscosa e pegajosa; por fim, acima dos  $70^\circ\text{C}$  surge a fase gama cujas propriedades são pouco conhecidas (Marciano e Michailesco 1989).

Os cones de guta-percha, comercializados para utilizar em Endodoncia, possuem na sua composição apenas cerca de 20% de guta-percha, 70% de óxido de zinco e os restantes 10% são resinas, corantes e sais metálicos. Esta mistura de componentes tem em vista a melhoria das propriedades físico-químicas e de manuseamento, nomeadamente a plasticidade, radiopacidade e a estabilidade dimensional, facilitando assim a sua utilização na obturação de canais radiculares (Leal 1998; Schmalz 2003; Ørstavik 2005).

As vantagens dos cones de guta-percha são inúmeras. A sua plasticidade permite uma adequada adaptação do material às paredes do canal radicular através da compactação com forças laterais ou verticais. Não alteram a cor da coroa do dente quando usados no limite cervical adequado. São biocompatíveis. São insolúveis nos fluidos orgânicos e dissolvidos por solventes conhecidos como o éter, o xilol, o eucaliptol, o benzeno, o dissulfeto de carbono e o clorofórmio (Hansen 1998). Esta propriedade facilita a sua remoção do canal radicular em caso de retratamento.

Contudo apresentam desvantagens, sobretudo a baixa rigidez em números pequenos, a falta de adesão aos cimentos endodônticos e à parede de dentina e a incapacidade de reforçar a estrutura radicular remanescente. Além disso, está excluída a possibilidade de esterilização prévia dos cones pelo calor, defendendo-se a realização de uma desinfecção antes da sua utilização no canal (Siqueira *et al.* 1998b), que pode ser feita através da imersão dos cones numa solução de hipoclorito de sódio a 5,25% durante 1 minuto (Gomes *et al.* 2005).

Os cones de guta-percha existem em tamanhos padronizados de acordo com as dimensões e conicidades dos instrumentos de preparação canalar.

A sua conservação deve ser realizada em local fresco e protegido da luz, para prevenir a sua oxidação, preservando assim a sua plasticidade e aumentando a longevidade dos mesmos.

#### 2.5.2.2. Cones de prata

Foram introduzidos para resolver a falta de rigidez dos cones de guta-percha de pequeno diâmetro. No entanto, a facilidade de inserção no interior do canal radicular, mesmo em casos de canais atrésicos em que não se conseguiu um adequado alargamento apical, depressa deixou de ser uma mais valia e passou a fomentar a subpreparação canalar, com o consequente negligenciamento da redução do conteúdo bacteriano do interior do canal antes da obturação. Além disso, a incapacidade dos cones de prata se adaptarem às irregularidades do canal facilita a infiltração de fluidos e a consequente corrosão (Ørstavik 2005). Os produtos resultantes da corrosão da prata são altamente citotóxicos e impedem a cicatrização apical (Seltzer *et al.* 1972). Por fim, o enfraquecimento das suas propriedades mecânicas pode transformar a necessidade de retratamento num desafio clínico de desfecho pouco previsível (Walton 1997).

Actualmente a sua utilização é considerada abaixo dos padrões mínimos de qualidade.

#### 2.5.2.3. Cones de guta-percha revestidos de resina

A tecnologia e a química dos adesivos dentinários, desenvolvidos e utilizados desde os anos 80 na área da Dentisteria Operatória, tem atraído, nos últimos anos, a atenção da Endodoncia. A possibilidade de desenvolver cimentos endodônticos com capacidade de ligação química à dentina radicular suscitou um enorme interesse da comunidade científica. A capacidade de incorporar monómeros de resina de metacrilato nos cimentos, com o propósito de facilitar a penetração de resina nos túbulos dentinários e a adesão à dentina radicular foi alcançada. No entanto, o conceito foi confrontado com a incapacidade de ligação entre as resinas de metacrilato, hidrofílicas, e o poliisopreno, hidrofóbico, constituinte da guta-percha.

Uma das soluções estudadas e implementadas foi o revestimento de cones de guta-percha (poliisopreno) com resina. Esta estratégia é possível graças à criação de um polímero específico, resultante da reacção de um dos grupos isocianato do diisocianato com o grupo hidroxil do *t*-hidroxil-polibutadieno, dado que este último tem capacidade de ligação ao poliisopreno hidrofóbico. Esta reacção é seguida pelo enxerto de um grupo funcional de metacrilato hidrofílico ao outro grupo isocianato. Desta forma conseguem-se produzir cones de guta-percha, com revestimento de resina, capazes de reagirem e unirem-se quimicamente aos cimentos endodônticos à base de resina de metacrilato. No entanto, numa análise ultraestrutural verificou-se que o revestimento de resina, de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , se encontra ocasionalmente ausente na periferia de alguns cones (Tay *et al.* 2005a). Este sistema é comercializado com o nome EndoREZ<sup>®</sup> (Ultradent), e preconiza a cimentação de um cone principal ao nível apical pretendido, com um cimento endodôntico à base de resina de metacrilato, de dupla polimerização, seguido do preenchimento do restante espaço do canal através inserção passiva de cones acessórios.

#### 2.5.2.4. Polímero de policaprolactona - Resilon<sup>™</sup>

Este material, desenvolvido em 2003 pela empresa Pentron Clinical Technologies, é composto por um polímero sintético de poliéster, a policaprolactona (Fig. 9), uma resina de metacrilato bifuncional com partículas de carga radiopacas e vidro bioactivo. A policaprolactona é um poliéster biodegradável, com ponto de fusão à volta dos 60°C e temperatura de transição vítrea de -60°C (Tay *et al.* 2005; Tay *et al.* 2006).

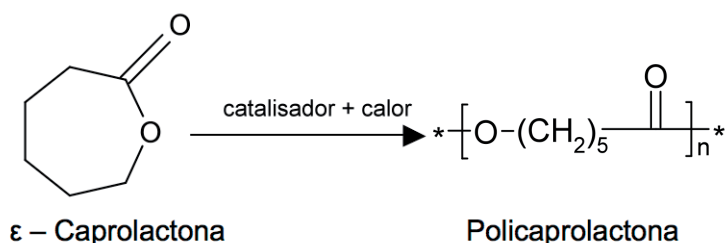


Figura 9 – Conversão do monómero em polímero de policaprolactona.

Este material está disponível sob a forma de cones padronizados e “pellets”, possibilitando o seu uso nas técnicas de compactação lateral, vertical

aquecida e termoplástica. Quando utilizado com o System B™ a temperatura recomendada são os 150°C e o nível 10 de potência. Tem um comportamento e propriedades de manuseamento semelhantes aos cones de guta-percha, nomeadamente o aspecto, insolubilidade nos fluidos orais e a termoplaticidade. Em caso de retratamento pode ser removido pelo calor ou com solventes orgânicos, como o clorofórmio.

Uma das principais virtudes deste material, segundo o fabricante, é a sua capacidade de ligação química efectiva com o cimento endodôntico do sistema, designado Epiphany™, e deste à dentina, sem existência de hiatos ou falhas entre eles. Esta ligação sequencial visa a formação de um preenchimento do espaço pulpar em “monobloco” (Chivian 2004).

No entanto, para alcançar este objectivo é ainda necessário melhorar alguns aspectos, como a percentagem de dimetacrilato incorporado no Resilon™, de modo a optimizar a ligação química com o cimento Epiphany™ (Tay *et al.* 2006).

A desinfecção do Resilon™ antes da obturação pode ser efectuada através da sua imersão, durante 1 minuto, numa solução de hipoclorito de sódio a 5,25%, clorohexidina a 2% ou MTAD (Royal *et al.* 2007). A avaliação por microscopia de força atómica da superfície dos cones submetidos à imersão, durante 1 minuto, numa solução de NaOCl a 5,25% ou CHX a 2%, não revelou alterações topográficas significativas dos mesmos. Pelo contrário, o período de imersão de 5 minutos revelou-se capaz de deteriorar a superfície dos cones (Isci *et al.* 2006).

Em condições fisiológicas o Resilon™ pode ser degradado por hidrólise alcalina das suas ligações éster (Tay *et al.* 2005c). Além disso, foi também demonstrada *in vitro* a biodegradação dos cones e do polímero de policaprolactona, pelas enzimas lipase PS<sup>1</sup> e colesterol esterase, sendo a hidrólise enzimática do Resilon™ mais rápida do que a do polímero de policaprolactona, para ambas as enzimas e em qualquer concentração estudada (Hiraishi *et al.* 2007). A clivagem das ligações éster da policaprolactona por enzimas salivares e bacterianas foi confirmada por outro estudo do mesmo grupo (Tay *et al.* 2005d).

### 2.5.3. Cimentos endodônticos

Os cimentos endodônticos destinam-se a preencher o espaço entre o material de núcleo e a parede de dentina radicular. Na clínica não devem ser usa-

---

<sup>1</sup> Lipase PS – Uma lipase verdadeira que demonstra a máxima actividade de clivagem das ligações éster para poliésteres insolúveis na água (Burkholderia cepacia, Amano Enzyme Inc, Nagoya, Japão).



dos isoladamente por serem solúveis ou sofrerem contracção de polimerização, propriedades que não se coadunam com o objectivo primordial da obturação, ou seja, impedir a microinfiltração ao longo do sistema canalar.

Nas técnicas de obturação mistas os cimentos são utilizados com diversos objectivos, designadamente, preencher as irregularidades do sistema canalar inacessíveis aos materiais sólidos, lubrificar o canal facilitando a introdução dos materiais de núcleo e, eventualmente, aproveitar as suas propriedades antibacterianas presentes durante a fase de presa (Walton 1997; Gutmann 2002).

Louis Grossman definiu as características e requisitos do cimento endodôntico ideal, que continuam ainda hoje a ser aceites e incluem: a apresentação homogénea após a mistura, o estabelecimento de boa ligação com as paredes de dentina radicular, a promoção do encerramento hermético do sistema de canais, a radiopacidade, a boa estabilidade dimensional, a não pigmentação da estrutura dentária, a insolubilidade nos fluidos orais, a reacção de presa lenta, a solubilidade nos solventes comuns de forma a permitir o retratamento se tal vier a ser necessário, a acção bactericida ou inibição do crescimento microbiano e a boa tolerância pelos tecidos periapicais (*cit in* Ørstavik 2005). Mais tarde, Ingle reforçou estes requisitos e acrescentou a necessidade de biocompatibilidade dos materiais, designadamente a ausência de potencial mutagénico ou carcinogénico, bem como o não desencadeamento de resposta imunológica pelos tecidos periapicais (Ingle 2002).

Os cimentos mais utilizados actualmente na clínica têm por base constituintes de natureza química muito diversa. Por uma questão de sistematização, agrupámos os materiais de acordo com o seu material de base: o óxido de zinco-eugenol, a resina polivinílica, o hidróxido de cálcio, o cimento de ionómero de vidro, o trifosfato de cálcio, o silicone, e as resinas acrílicas, que desenvolveremos de seguida.

#### 2.5.3.1. Óxido de zinco-eugenol

Estes materiais dominaram os últimos 70 a 80 anos. Os seus protótipos foram o cimento de Rickert, ainda hoje largamente utilizado, e comercializado com a marca Pulp Canal Sealer® (Kerr), e o cimento de Grossman, que dispõe de diversas variantes comerciais, entre elas, o cimento Roth® e o Proco-Sol™ (Star). A fórmula introduzida por Rickert inclui partículas de prata para obter radiopacidade, enquanto que Grossman recorreu à inclusão de sais de bário e de bismuto (Ørstavik 2005).

O cimento Pulp Canal Sealer®, idealizado por Rickert, em 1931, surgiu numa época em que a obturação canalar era efectuada com recurso a guta-percha plastificada por solventes. Quer a cloropercha (guta-percha dissolvida em clorofórmio), quer a eucapercha (eucaliptol), sofrem alterações dimensionais acentuadas durante a fase de evaporação do solvente. O cimento foi idealizado por Rickert para compensar esta falta de estabilidade dimensional e consiste na mistura extemporânea de um pó, predominantemente óxido de zinco, com um líquido, o eugenol. A prata confere radiopacidade, as resinas melhoram a plasticidade e o iodo é um poderoso antisséptico (Van Noort 1994).

A reacção de presa do óxido de zinco-eugenol tem por base uma combinação de processos físico-químicos, que levam à formação de uma massa de óxido de zinco incluída numa matriz de cristais de eugenolato de zinco, longos e em forma de bainha, cuja formula química é  $(C_{10}H_{11}O_2)_2Zn$ . Durante a reacção ocorre absorção do eugenol e o endurecimento da mistura deve-se à formação de eugenolato de zinco. São factores determinantes da reacção de presa, a presença de água, o tamanho das partículas de óxido de zinco, o pH e os aditivos. O tempo de presa está intimamente relacionado com o método de preparação. O aumento da temperatura e da humidade, bem como uma espatulação longa e vigorosa, diminuem o tempo de presa. Pelo contrário, a redução do tamanho das partículas de óxido de zinco conduz a um aumento do mesmo (Hashieh *et al.* 1999).

Na generalidade, após a reacção de presa destes cimentos permanece algum do eugenol livre e existem estudos com culturas celulares que o identificaram como o principal responsável pela citotoxicidade do material, além de ser considerado neurotóxico e irritante (Barbosa *et al.* 1993). Nos testes de implantação subcutânea estes materiais também demonstraram despertar uma resposta inflamatória intensa (Olsson *et al.* 1981; Yesilsoy *et al.* 1988).

Foi igualmente comprovada, *in vitro*, a capacidade destes cimentos inibirem o crescimento bacteriano, até uma semana após a sua reacção de presa, sendo este um forte argumento apresentado pelos seus defensores (al-Khatib *et al.* 1990).

Surgiram, ainda, algumas modificações da composição base destes cimentos, com adição de medicamentos com capacidade antisséptica e anti-inflamatória. A Endomethasone® (Septodont) e o N-2 de Sargenti são dois exemplos deste tipo de produtos. Ambos contêm formaldeído, um potente antisséptico, com elevado potencial tóxico, mutagénico e carcinogénico. Contêm também corticosteróides, com o intuito de diminuir a reacção inflamatória e as complicações pós-operatórias. Nos testes de avaliação da citotoxicidade estes materiais ocupam lugares de destaque, demonstrando consistentemente uma elevada toxicidade (Geurtsen *et al.* 1998; Lewis 1998).

### 2.5.3.2. Resinas polivinílicas

Foram introduzidas na Europa por Schmitt, em 1951, e têm como principal representante o cimento comercializado sob a designação de Diaket (3M ESPE). O composto principal, um polímero sintético, forma-se a partir de uma reacção de adição entre um grupo carbonilo (grupo cetona) de um alceno, com um composto orgânico neutro, originando uma poliacetona. As poliacetonas, por sua vez, tem uma reacção de quelação com o óxido de zinco e formam complexos cíclicos, com estrutura tridimensional, insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos como o clorofórmio (Allinger 1978).

Este material apresenta-se como um pó, muito fino, para mistura extemporânea com um líquido viscoso, a poliacetona, que após a reacção de presa apresenta a seguinte estrutura química (Fig. 10).

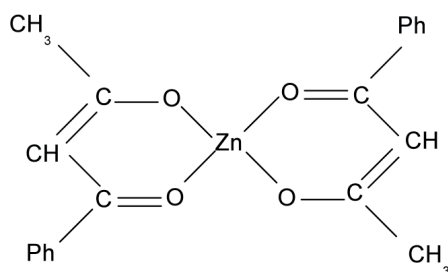


Figura 10 – Estrutura química após a reacção de presa das resinas polivinílicas.

No que concerne à biocompatibilidade, o material demonstrou um elevado grau de toxicidade, quando recém-misturado, verificando-se uma redução da citotoxicidade após a reacção de presa terminada, em culturas de células de polpa de rato (Matsumoto *et al.* 1989). Por outro lado, quando testado em cultura de células de carcinoma cervical humano (HeLa) e fibroblastos da pele do rato (L929), imediatamente após a mistura dos seus constituintes, e quando comparado com outros 3 materiais, demonstrou menor toxicidade que o AH 26® (Maillefer/Dentsply) e do que o AH Plus™ (Maillefer/Dentsply), tendo apenas o Apexit® (Ivoclar/Vivadent) demonstrado melhores resultados (Miletic *et al.* 2000).

### 2.5.3.3. Resinas epóxicas

O protótipo destes cimentos foi desenvolvido na Suíça, em 1954, por André Schroeder, tendo por base um copolímero de resina bis-fenol e hexame-

tilenotetramina como agente de polimerização (Schroeder 1954). A série de resinas com a designação AH foi a melhor sucedida comercialmente, embora, o produto inicial, AH 26® (Maillefer/Dentsply), ao utilizar como agente iniciador a hexametenotetramina (também conhecida como urotropina), liberte formaldeído como subproduto da reacção, pelo que se procuraram substituintes para aquele componente. O resultado foi alcançado com a utilização de uma mistura de aminas capazes de iniciar a polimerização, sem formação de formaldeído, comercializada com a designação AH Plus™ (Maillefer/Dentsply). Este último, apresenta-se sob a forma pasta A e pasta B, para mistura extemporânea, desencadeando-se uma reacção de adição com formação de um polímero de epoxiamina, cujo produto final é um polímero linear sem a formação de nenhum subproduto residual (Leonardo *et al.* 1999).

A capacidade de prevenir a microinfiltração foi avaliada, *in vitro*, num modelo de análise quantitativa de lisozima radiomarcada, e demonstrou resultados superiores quando comparado com os cimentos Sealapex™ (SybronEndo) e Sealite® (Pierre Roland) (Haikel *et al.* 1999).

#### 2.5.3.4. Hidróxido de cálcio

O sucesso do hidróxido de cálcio, usado como protecção pulpar ou como medicação canalar, estimulou a sua utilização na composição dos cimentos endodônticos. O Sealapex™ (SybronEndo) e o Apexit® (Ivoclar/Vivadent) são os casos mais relevantes de sucesso comercial deste tipo de cimentos. A reacção de presa destes materiais é bastante heterogénea constatando-se que o contacto com a humidade produz uma superfície dura, permanecendo a parte mais profunda da mistura com consistência pastosa. Este tipo de produtos tem um desempenho muito bom em testes de microinfiltração *in vitro* (Xu *et al.* 2005), biológicos (Yesilsoy *et al.* 1988; Geurtsen *et al.* 1998; Kolokouris *et al.* 1998; Miletic *et al.* 2000), em testes clínicos em animais (Tagger e Tagger 1989; Berbert *et al.* 2002; Holland *et al.* 2005) e humanos (Waltimo *et al.* 2001). Todavia, a sua falta de rigidez física levanta preocupações quanto ao seu uso clínico uma vez que a compactação eficaz do material de núcleo é fundamental para minimizar o risco de deslocamento do material de obturação durante a preparação de espaço para núcleo fundido ou espigão intrarradicular (Ørstavik 2005).

Tabela 1 – Tipos e componentes dos principais cimentos endodônticos

<b>Tipo</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Componentes principais</b>
<b>ZnO-eugenol</b>	Roth®	ZnO-eugenol, colofônio, sais de bismuto e de bário
	PCS®	ZnO-eugenol, timol, prata
	Endomethasone®	ZnO-eugenol, paraformaldeído
<b>Resinas polivinílicas</b>	Diaket®	ZnO, poliacetona, sais de bismuto
<b>Resinas epóxicas</b>	AH 26®	Resina epóxica bis-fenol, óxido de bismuto, hexametilenotetramina
	AH Plus™	Resina epóxica bis-fenol, óxido de zircônio, amina adamantana
	Acroseal®	Resina epóxica bis-fenol, metenamina, enoloxona, Ca(OH) <sub>2</sub>
<b>Hidróxido de cálcio</b>	Sealapex™	Ca(OH) <sub>2</sub> , sais de bário, ZnO, salicilato de tolueno
	Apexit®	Ca(OH) <sub>2</sub> , colofônio, salicilatos
<b>Ionómeros de vidro</b>	Ketac-Endo™	Polialquenoato
<b>Silicones</b>	RoekoSeal®	Polidimetilsiloxano, óleo de silicone, óxido de zircônio
	GuttaFlow®	Polidimetilsiloxano, óleo de silicone, óxido de zircônio, guta-percha
<b>Trifosfato de cálcio</b>	ARS®	α-trifosfato de cálcio, hidroxiapatite, ácido poliacrílico
<b>Resinas de metacrilato</b>	EndoRez™	UDMA
	Epiphany™	BisGMA, UDMA e metacrilatos hidrofílicos

#### 2.5.3.5. Ionómeros de vidro

Quimicamente designados de polialquenoatos de vidro, apresentam bio-compatibilidade superior aos clássicos cimentos à base de óxido de zinco-eugenol (Leonardo *et al.* 1998) e evidenciam algum nível de adesão química à dentina (Chung *et al.* 2001; Saleh *et al.* 2002; Tagger *et al.* 2002), ambas propriedades desejáveis num cimento endodôntico. A sua otimização, no sentido de aumentar o tempo de presa e adequar as suas propriedades à utilização na obturação de canais, levou ao desenvolvimento e comercialização do Ketac™ Endo Aplicap™ (3M-ESPE), durante os anos 80. A sua eficácia clínica foi avaliada num estudo prospectivo, multicêntrico, que envolveu o tratamento de 486 dentes e o seu seguimento por um período de 6 a 18 meses, capaz de dar suporte científico à sua utilização, dado ter sido constatado um prognóstico sobreponível ao verificado

com os materiais de obturação clássicos (Friedman *et al.* 1995). No entanto, foram identificados no laboratório problemas relacionados com a sua desintegração e solubilidade (Schafer e Zandbiglari 2003), bem como dificuldades de remoção do canal, traduzidas por um aumento do tempo necessário para a realização do retratamento destes casos (Moshonov *et al.* 1994).

Foram ainda estudadas, *in vitro* e *in vivo*, outras formulações de cimentos de ionómero de vidro, com a designação de teste KT-308 ou o ZUT, contendo um composto antimicrobiano, ambos com melhores prestações do que o produto original e por isso com potencial para serem utilizados clinicamente (Friedman *et al.* 2000; Padachey *et al.* 2000). Apesar disso, além do Ketac Endo™ nenhum outro produto desenvolvido com esta composição de base chegou à fase de comercialização.

#### 2.5.3.6. Silicones

São materiais quimicamente estáveis, têm boa fluidez, capacidade de penetração nos túbulos dentinários (Fig. 11). O Lee Endo-Fill® (Lee Pharmaceuticals) foi o primeiro material deste tipo a ser comercializado, surgindo posteriormente o RoekoSeal (Colténe/Whaledent), que não sofre contracção durante a polimerização e usa a platina como agente catalisador. Este material tem uma excelente biocompatibilidade (Miletic *et al.* 2005) e capacidade de prevenir a microinfiltração (Cobankara *et al.* 2002; Ozok *et al.* 2008). A sua eficácia foi avaliada num estudo clínico aleatorizado, com 12 meses de acompanhamento, e os resultados observados foram sobreponíveis ao material de controlo ou padrão, um cimento à base de óxido de zinco-eugenol (Huumonen *et al.* 2003).

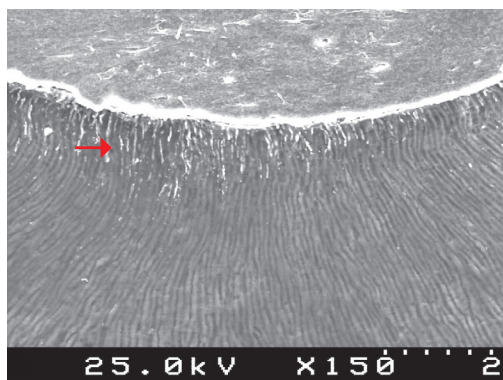


Figura 11 – Imagem de microscopia electrónica de varrimento ilustrando a interface guta-percha/RoekoSeal/dentina radicular, onde se visualiza a penetração do RoekoSeal nos túbulos dentinários adjacentes (MEV).

Uma modificação deste cimento, o GuttaFlow® (Coltène/Whaledent), no qual foram incorporadas partículas de guta-percha triturada de pequeno tamanho na base de silicone, preconiza a injeção do cimento no interior do canal, seguida da introdução passiva do cone mestre e dos cones acessórios de guta-percha. Este material revelou em testes de toxicidade *in vitro* ser melhor tolerado do que o AH Plus™, o Epiphany™ sealer ou o Resilon™ (Bouillaguet *et al.* 2006). Ao contrário da maioria dos cimentos endodônticos, que sofrem contracção de polimerização, neste material ocorre uma ligeira expansão que pode contribuir para a preenchimento tridimensional do sistema canal (Hammad *et al.* 2008). A avaliação da capacidade de prevenir a microinfiltração, realizada *in vitro* num modelo de inoculação polimicrobiana, revelou um desempenho superior deste cimento comparativamente com os clássicos AH Plus™ e Pulp Canal Sealer® (De-Deus *et al.* 2007).

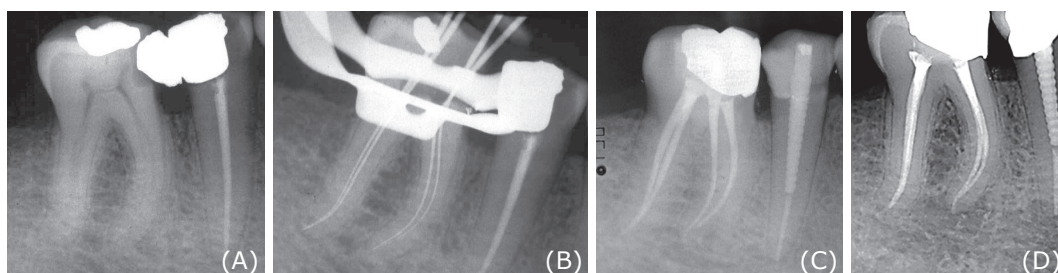


Figura 12 – Sequência de imagens radiográficas ilustrando um tratamento endodôntico com obturação canal com GuttaFlow®. Radiografia pré-operatória (A), per-operatória (B), após restauração coronária (C) e 3 anos após obturação (D).

#### 2.5.3.7. Trifosfato de cálcio

Os cimentos à base de trifosfato de cálcio são populares no Japão, onde o material mais expressivo é o Apatite Root Sealer® (Sankin/Dentsply), existindo com 3 formulações distintas. O tipo I tem a composição base descrita na tabela 1, sendo a esta adicionado 5% de iodofórmio no tipo III, e 30% de iodofórmio e produtos radiopacos no tipo II. Após a mistura, ocorre uma reacção de auto-polimerização e forma-se uma fluorapatite sólida microporosa (Steinbrunner *et al.* 1998). Apresentam como vantagens o facto de não serem antigénicos nem desencadearem reacções de corpo estranho, e nos testes de biocompatibilidade apresentam um bom desempenho (Bilginer *et al.* 1997; Kim *et al.* 2004).

#### 2.5.3.8. Resinas de metacrilato – Endorez™, Epiphany™

##### **EndoREZ™**

Este cimento, de dupla polimerização, apresenta cerca de 50% de carga, conseguidos com partículas de clorato de bismuto, lactato de cálcio pentahidratado e dióxido de silicone. Preconiza-se a utilização deste cimento em associação com os cones de guta-percha revestidos de resina, do mesmo sistema EndoRez™ (Ultradent), utilizando um cone principal com “tug-back” no comprimento de trabalho, seguido da inserção passiva de cones acessórios, sem recurso a compactação lateral ou vertical.

Numa avaliação deste material realizada por Tay e colaboradores, *in vitro*, esta técnica permitiu resultados radiográficos adequados, com densidade homogênea e preenchimento de alguns canais laterais. Numa análise ultraestrutural foi possível identificar zonas livres de falhas a coexistirem com outras contendo hiatos, quer na interface material de núcleo/cimento, quer na interface cimento/dentina radicular. A ligação entre o diisocianato do revestimento de resina e a guta-percha manteve sempre a integridade, ocorrendo apenas falhas de ligação entre o revestimento de resina dos cones e o cimento endodôntico. Esta observação sugere que a ligação química entre o poliisopreno e o terminal polibutadieno do diisocianato é mais forte do que a ligação entre o terminal metacrilato do diisocianato e o cimento endodôntico de resina. Uma possível explicação para este facto, avançada pelos autores, prende-se com a falta de uma camada superficial inibida pelo oxigénio, que é necessária à optimização das forças de ligação das resinas de metacrilato. Foram observadas também extensas áreas de “resin tags”, no terço médio e cervical, com comprimento entre os 800 a 1200 µm, muito acima dos valores publicados para outros cimentos, atribuíveis à natureza hidrofílica do material (Tay *et al.* 2005a).

##### **Epiphany™**

Este material foi desenvolvido pela Pentron Clinical Technologies, no sentido de obter um cimento capaz de fazer a selagem dos túbulos dentinários e aderir simultaneamente à parede de dentina radicular e ao material de núcleo, possibilitando assim o controlo da microinfiltração e o reforço estrutural da raiz (Teixeira *et al.* 2004).



O sistema preconiza um protocolo de irrigação final, com remoção da "smear layer", do qual estão excluídos o hipoclorito de sódio ou o peróxido de hidrogénio, pelo seu potencial de inibição da reacção de polimerização das resinas de metacrilato. Após secagem do canal com pontas de papel absorvente aplica-se o Epiphany™ primer (Fig. 13). Este é composto por um monómero funcional que tem como grupo terminal um ácido sulfónico, HEMA, água e um iniciador de polimerização. Deve ser aplicado durante 20 segundos e a sua função é condicionar a dentina radicular (Fig. 14), preparando o substrato para a sua ligação ao cimento endodôntico Epiphany™. A composição deste material conta com uma matriz de resina, 30% em peso, constituída por uma mistura de bisfenoldiglicidilmetacrilato (bis-GMA), uretanodimetacrilato (UDMA), polietilenoglicoldimetacrilado (PEGDMA) e bisfenoldimetacrilato etoxilado (EBDMA). Contém um total de 70% de peso em partículas de carga, entre as quais se encontram o hidróxido de cálcio, o sulfato de bário, o vidro e a sílica (Shipper *et al.* 2004). A obturação é completada com a inserção do material de núcleo Resilon™, sob a forma de cones ou por injeção termoplástica, que tem capacidade de ligação química com o cimento Epiphany™. Este composto, de dupla polimerização, deve, segundo o fabricante, ser fotopolimerizado durante 20 segundos, de modo a endurecer os 2 milímetros coronários, sendo depois a autopolimerização responsável pela extensão do processo até à região apical, nos 15 a 30 minutos subsequentes. A afinidade química do material de núcleo e do cimento endodôntico, associada à ligação deste à dentina, favorecida pelo "primer", visa o desenvolvimento de uma obturação homogénia e foi apelidada de "monobloco" pelos seus criadores (Chivian 2004; Teixeira *et al.* 2004).



Figura 13 – Componentes do sistema Epiphany™: "primer" e cimento endodôntico.

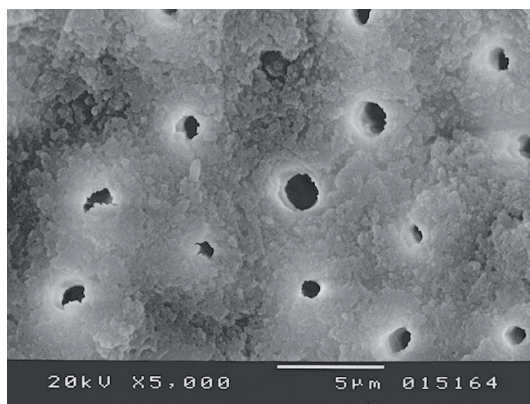


Figura 14 – Imagem de MEV onde se visualiza a modificação da "smear layer" após condicionamento da dentina radicular com o Epiphany™ primer.

Desde a sua introdução no mercado em 2004, até à data, têm sido publicados diversos estudos acerca deste novo sistema de obturação canal, existindo neste momento alguma controvérsia entre os resultados inicialmente apresentados e as publicações mais recentes (Shipper *et al.* 2004; Shipper *et al.* 2005; Biggs *et al.* 2006; Onay *et al.* 2007; Raina *et al.* 2007; Tay e Pashley 2007).

Os estudos iniciais, realizados fundamentalmente pelo grupo de investigadores responsável pelo desenvolvimento do material, demonstraram que quando comparado com as clássicas técnicas mistas de obturação com guta-percha, o sistema Resilon™/Epiphany™ apresenta uma clara superioridade no que se refere à resistência à microinfiltração bacteriana (Shipper *et al.* 2004), no aumento da resistência à fractura da estrutura radicular remanescente (Teixeira *et al.* 2004), e ainda na capacidade de prevenir o desenvolvimento de periodontite apical (Shipper *et al.* 2005).

Estudos independentes subsequentes demonstraram uma boa resistência à microinfiltração, tendo os resultados publicados oscilado desde a manutenção da superioridade do sistema Resilon™/Epiphany™ face às técnicas clássicas (Sagsen *et al.* 2006; Stratton *et al.* 2006) até à não existência de diferenças estatisticamente significativas entre ambas (Biggs *et al.* 2006; Onay *et al.* 2006; Pitout *et al.* 2006; Raina *et al.* 2007). No que concerne ao aumento de resistência à fractura, os estudos recentes têm também apresentado resultados heterogêneos, pois não foram encontradas diferenças quando comparado com a técnica clássica de guta-percha e cimento AH Plus™ (Gesi *et al.* 2005), não tendo sido demonstrado reforço estrutural com nenhuma das duas técnicas (Williams *et al.* 2006). Todavia, num estudo recente, foi observado um aumento da resistência à fractura vertical quando comparado com o sistema EndoREZ™, GuttaFlow® ou cimento de óxido de zinco (Hammad *et al.* 2007).

A biocompatibilidade do cimento Epiphany™ foi avaliada num modelo de implantação subcutânea e comparada com o Resilon™ e a guta-percha. Os períodos de observação foram de 1, 4 e 8 semanas, durante os quais não se evidenciaram diferenças na resposta tecidular aos vários materiais em estudo. A reacção inflamatória diminui às 4 semanas e continuou a regredir até à 8ª, pelo que os autores consideraram que todos os materiais em estudo possuem um nível de biocompatibilidade aceitável (Onay *et al.* 2007). Num modelo de implantação intraóssea, com períodos de avaliação às 4 e 12 semanas, foi comparada a biocompatibilidade do cimento Epiphany™ com o EndoREZ™ e o AH Plus™. Em ambos os períodos a reacção inflamatória ao EndoREZ™ foi considerada grave, para o AH Plus™ passou de grave às 4 semanas a moderada às 12, ao passo que a reacção ao cimento Epiphany™ foi considerada ligeira a ausente em ambos os períodos (Sousa *et al.* 2006).

A eficácia funcional da obturação canalар com Resilon™/Epiphany™ ou com guta-percha/AH Plus™ foram comparadas num modelo experimental animal. Após obturação dos canais com cada uma destas associações de material de núcleo/cimento, os dentes foram divididos num grupo controlo negativo, no qual não foi realizada qualquer intervenção adicional, e num grupo teste, no qual as câmaras pulpares foram abertas e inoculadas com placa bacteriana. No final do estudo, os dentes do grupo teste obturados com guta-percha/AH Plus™ apresentaram um nível de inflamação periapical ligeira superior aos obturados com Resilon™/Epiphany™ (82% vs 19%), bem como superior ao controlo negativo (22%), o que foi interpretado pelos autores como sendo consequência de uma maior resistência à microinfiltração coronária por parte dos novos materiais (Shipper *et al.* 2005).

Recentemente foi publicado o único ensaio clínico existente até à data, que envolveu a análise retrospectiva de 82 casos, com um acompanhamento mínimo de 1 ano após a obturação. A taxa de sucesso para dentes que apresentavam antes do tratamento um índice periapical (PAI) 1 e 2 (considerados sem lesão periapical) foi de 90%, enquanto que para dentes com lesão periapical (PAI 3-5) a taxa não ultrapassou os 50%. No entanto, dos outros 50% que continuaram com sinais radiográficos de patologia periapical, 23% apresentaram alguma melhoria (traduzida pela diminuição do tamanho da radiotransparência). Por isso os autores consideraram lícito somar a taxa de sucesso com a percentagem de lesões em processo de cicatrização, o que fez um valor total de 73%, sendo considerado um valor sobreponível aos alcançados com os materiais e técnicas de referência (Conner *et al.* 2007).

## 2.6. Restauração coronária

A importância de uma restauração coronária capaz de prevenir ou impedir a microinfiltração para o canal radicular foi avaliada em vários estudos epidemiológicos transversais. O objectivo inicial destes estudos é sobreponível e prende-se com a procura de uma relação entre a qualidade técnica da restauração coronária e do tratamento endodôntico com o estado periapical dos dentes, avaliado radiograficamente. Ray e Trope levaram a cabo uma investigação envolvendo 1010 dentes com tratamento endodôntico e concluíram que, a qualidade da restauração coronária tem uma maior influência no estado periapical dos dentes do que a qualidade da obturação canalar. Os resultados do estudo revelaram que os dentes com restauração definitiva considerada de boa qualidade apresentaram uma taxa de sucesso (ausência de periodonte apical) de 80%, enquanto que nos dentes com restauração coronária deficiente o valor foi de 30%. Os dentes com boa qualidade da obturação canalar apresentaram uma taxa de 75%, ao passo que com má qualidade o valor foi de 48%. A associação da condição favorável para ambas as variáveis conduziu à taxa de sucesso mais elevada, que foi de 91%, enquanto que a associação de ambas as condições desfavoráveis conduziu a uma taxa de sucesso de apenas 18% (Ray e Trope 1995). No entanto, um estudo realizado por Tronstad e colaboradores, com uma amostra de 1001 dentes, evidenciou que a qualidade técnica do tratamento endodôntico é o factor crucial na ausência de radiotransparência periapical. Os melhores resultados observados neste estudo foram para os dentes com boa obturação canalar e boa restauração coronária (81%), sendo seguido pela combinação de boa obturação canalar com má restauração (71%). Os grupos com tratamento endodôntico de má qualidade apresentaram resultados mais baixos independentemente da qualidade da restauração (56%). Perante os resultados observados, os autores concluem que a qualidade da restauração apenas apresenta impacto no prognóstico de dentes com tratamento endodôntico de boa qualidade, sendo este último o factor primordial para o sucesso (Tronstad *et al.* 2000). Ainda outro estudo acerca deste tema, realizado por Siqueira e colaboradores, com uma amostra de 2051 dentes, revelou também que o factor de maior relevo é a qualidade da obturação canalar, não obstante, a qualidade da restauração coronária apresentou um impacto significativo, sobretudo em dentes com má qualidade de tratamento endodôntico (Siqueira *et al.* 2005c). Por fim, Hommez e colaboradores, com uma amostra de 745 dentes, concluíram que quer a qualidade técnica do tratamento endodôntico quer da restauração coronária têm impacto no estado dos tecidos periapicais. No entanto, restaurações coronárias de diferente qualidade influenciaram os resultados encontrados quer para dentes com boa quer com má qualidade da obturação mas não a um nível esta-

tisticamente significativo. Um achado interessante deste estudo foi o nível mais elevado de ausência de rarefação apical em dentes com restauração a amálgama (72%) do que em dentes restaurados a compósito (60%) (Hommez *et al.* 2002).

Apesar de conhecermos as limitações inerentes ao valor diagnóstico da radiologia na identificação de lesões periapicais, sobretudo relacionadas com a impossibilidade das técnicas convencionais detectarem lesões apenas limitadas ao osso esponjoso, podemos notar nos estudos anteriores uma tendência comum, que se traduz num impacto negativo da má qualidade técnica da restauração coronária sobre o prognóstico do tratamento endodôntico.

A constatação de que dentes com tratamento endodôntico associados a restaurações coronárias deficientes apresentam um pior prognóstico fomentou a análise comparativa da microflora destes com aqueles que apresentam uma restauração coronária de qualidade. O estudo por técnicas de biologia molecular permitiu identificar uma biodiversidade bacteriana estatisticamente superior em canais obturados com restauração coronária deficiente (Hommez *et al.* 2004).

Não obstante, a relevância clínica da restauração coronária no prognóstico do tratamento endodôntico mantém-se ainda como um tema em discussão aberta, que necessita de um maior número e qualidade de provas científicas para ser clarificado. Um estudo clínico prospectivo recente, no qual foi estudada a influência da realização ou não da restauração definitiva após tratamento endodôntico, revelou uma taxa de sucesso superior para os dentes portadores de restaurações definitivas do que para os portadores de provisórias. Contudo, a análise estratificada, com base no factor confundente (diagnóstico pré-operatório) demonstrou que não existe associação estatisticamente significativa entre o tipo de restauração e o prognóstico do tratamento endodôntico. O estudo identificou um viés relacionado com a maior probabilidade do clínico realizar uma prótese fixa ou uma restauração de elevada qualidade num dente sem periodontite apical, ao passo que tende a protelar a restauração definitiva de dentes com lesão radiográfica periapical ou com obturação canalar deficiente. Este comportamento sugere um viés na selecção do tratamento com impacto significativo no prognóstico e na análise genérica dos resultados (Chugal *et al.* 2007).

### **3. Periodontite apical pós-tratamento endodôntico**

O objectivo do tratamento endodôntico convencional é a manutenção ou restabelecimento da integridade dos tecidos periapicais e os casos em que não é possível atingir este objectivo têm sido designados de insucessos, embora, como

vamos de seguida descrever, possam ser designados de forma mais adequada como periodontite apical pós-tratamento.

A melhor evidência disponível para avaliar o prognóstico do tratamento endodôntico está alicerçada nos estudos de *coorte* e tem como base da análise dos resultados a classificação dos casos em: “curados”, “cura em progresso” ou com “patologia emergente/persistente”. O termo “curado” refere-se à combinação de normalidade clínica (ausência de sinais e sintomas) e radiográfica (sem radiotransparência apical); “cura em progresso” traduz normalidade clínica associada a redução da dimensão da radiotransparência apical; por último “patologia emergente/persistente” ocorre quando existe radiotransparência apical (nova, inalterada ou aumentada), associada ou não a sinais ou sintomas clínicos. Friedman efectuou uma revisão da literatura com selecção dos estudos publicados mais relevantes e concluiu que se pode esperar um prognóstico de 93 a 98% de cura após o tratamento endodôntico convencional de dentes sem periodontite apical. Para dentes com diagnóstico pré-operatório de periodontite apical a taxa de cura expectável é de 73 a 83%, sendo provável que 10 a 20% dos dentes apresentem “cura em progresso” no final do “follow-up”, que foi no mínimo de 4 anos nos estudos seleccionados (Friedman 2008). Podemos daqui inferir, grosso modo, que existem de 5 a 10% dos dentes que apresentam patologia emergente/persistente ou, por outras palavras, os casos com periodontite apical pós-tratamento endodôntico. No entanto, dentro destes, uma porção permanece funcional, isto é, com sinais radiográficos e clínicos de patologia mas sem apresentar sintomatologia que perturbe o paciente ao ponto de limitar a sua utilização.

O espectro de possibilidades etiológicas da periodontite apical pós-tratamento é muito vasto e o processo de decisão terapêutica mais complexo e heterogéneo do que na abordagem da periodontite apical primária (Reit e Dahlen 1988; Cheung 1996; Briggs e Scott 1997).

Um estudo epidemiológico, realizado nos EUA, que incidiu sobre uma amostra de 14 milhões de indivíduos com um plano de saúde privado, no qual foram realizados 1.462.936 tratamentos endodônticos convencionais, verificou-se que 97,1% dos dentes tratados permaneciam na cavidade oral ao fim de 8 anos. A grande maioria dos insucessos de tratamento que necessitaram de intervenção adicional do tipo retratamento, cirurgia apical ou extracção revelou-se dentro dos 3 primeiros anos após o tratamento inicial. O retratamento foi realizado em 0,4% (5.784) dos dentes e a cirurgia apical foi a abordagem escolhida para 0,6% (9.387) da totalidade dos dentes tratados no estudo. A análise desta opção



terapêutica por sectores, anterior, prémolares e molares demonstrou que a cirurgia apical foi maioritariamente realizada no sector anterior (em 3.767 dentes). Este facto pode resultar de diversas razões, entre elas: a maior frequência de lesões quísticas na região anterior do maxilar, a maior propensão para as lesões afectarem a integridade da cortical e a consequente facilidade de diagnóstico radiográfico, bem como o maior conforto dos profissionais para realizarem cirurgia apical na região anterior do que na posterior, devido à facilidade de acesso e à melhor visibilidade. Dos 42.190 (2,9%) dentes extraídos durante os 8 anos de "follow up", verificou-se que 83% não apresentavam restauração coronária com recobrimento total das cúspides (Salehrabi e Rotstein 2004).

Outro estudo semelhante, realizado em Taiwan, sobre uma amostra de 1.557.547 dentes tratados por médicos dentistas generalistas, revelou uma taxa de sobrevivência de 93% ao fim de 5 anos. Verificou-se a ocorrência de patologia periapical pós-tratamento em 10,3% (159.680) dos casos, dos quais 32% foram sujeitos a retratamento, 3% a cirurgia apical e 65% extraídos (Chen *et al.* 2007).

Estes estudos epidemiológicos revelam uma taxa de sobrevivência bastante elevada para o tratamento endodôntico, no entanto, como foi anteriormente abordado, os conhecimentos obtidos a partir dos ensaios clínicos permitem-nos saber que a taxa de sucesso do tratamento é inferior à taxa de sobrevivência, estimando-se que a diferença entre ambas seja ao redor dos 10%, que representam os casos de patologia persistente ou emergente (Friedman 2008).

### 3.1. Etiologia

É reconhecido que uma das causas mais comuns de insucesso do tratamento endodôntico se prende com o baixo padrão de execução técnica no que respeita à aplicação dos princípios que permitam uma adequada eliminação e controlo da infecção intrarradicular. Entre os procedimentos operatórios que mais vezes são comprometidos durante o tratamento e que podem condicionar o sucesso do mesmo destacamos: a não utilização de isolamento absoluto do campo operatório, o desenho da cavidade de acesso mal executado, os canais não-identificados, o incorrecto estabelecimento do comprimento de trabalho, a insuficiente instrumentação e irrigação, e restaurações coronárias temporárias e definitivas incapazes de prevenir a microinfiltração de fluidos e microrganismos da cavidade oral (Lin *et al.* 1992; Nair 2006). Além disso, os erros de

procedimento como fracturas de instrumentos, perfurações, sobreobturações, subobturações ou degraus prejudicam também o prognóstico, não de forma directa, mas por impedirem o cabal cumprimento dos objectivos iniciais do tratamento (Siqueira 2001).

Existem contudo situações em que o tratamento seguiu os mais elevados padrões de qualidade e, mesmo assim, não se consegue eliminar ou prevenir o aparecimento de patologia periapical. A responsabilidade biológica desta situação pode ser atribuída na maioria das situações a factores microbianos, incluindo a infecção intra ou extrarradicular (Tronstad *et al.* 1987; Molander *et al.* 1998; Sundqvist *et al.* 1998; Sunde *et al.* 2002). Todavia, nalguns casos estão envolvidas causas não microbianas, intrínsecas ou extrínsecas (Simon 1980; Simon *et al.* 1982; Nair *et al.* 1998; Nair 2006).

### 3.1.1. Causas não-microbianas

Da revisão bibliográfica realizada salientamos como causas não-microbianas extrínsecas, a presença de celulose nos tecidos periapicais, com origem em cones de papel, bolas de algodão ou partículas de vegetais da alimentação inadvertidamente introduzidas nos tecidos periapicais (Simon *et al.* 1982; Koppang *et al.* 1989). A celulose é um polissacarídeo com origem na parede celular das células vegetais que não é digerido pelo homem nem degradado pelas células de defesa do organismo, resultando a sua presença no desenvolvimento de reacção de corpo estranho e no aparecimento ou manutenção da patologia periapical. Também os materiais de obturação canal, como a guta-percha contaminada superficialmente com partículas de pó-talco ou outros materiais, mostraram capacidade de impedir a cicatrização periapical (Nair *et al.* 1990). Como causas intrínsecas assinalamos a presença de cristais de colesterol no periápice, com possível origem na desintegração de células como os eritrócitos, linfócitos ou macrófagos, ou mesmo nos lípidos circulantes, não fagocitáveis por células gigantes multinucleadas (Nair *et al.* 1998).

Outra causa possível, que ainda permanece envolta de alguma controvérsia, são os quistos radiculares verdadeiros. Segundo alguns autores, os pseudoquistos ou quistos perirradiculares em bolsa, por manterem contacto directo entre o seu interior e o canal radicular através do *foramen* apical, são susceptíveis de regredirem após tratamento endodôntico convencional. Pelo contrário, os quistos radiculares verdadeiros possuem cavidades completa-



te revestidas por epitélio, sem comunicação directa com o canal radicular, apresentando por isso um crescimento auto-sustentado e não condicionado pelo tratamento do canal radicular, pelo que a sua resolução fica dependente da abordagem cirúrgica (Nair 1998).

Por fim, a cicatrização com reparação e formação de tecido cicatricial de natureza fibrosa também pode justificar a persistência de radiotransparência apical pós-tratamento (Nair *et al.* 1999).

### 3.1.2. Causas microbianas

Como já foi anteriormente referido, as lesões periapicais refractárias ao tratamento endodôntico podem resultar da existência de microrganismos a causar infecção extra-radicular, nomeadamente espécies do género *Actinomyces* e o *Propionibacterium propionicum*, que possuem mecanismos de patogenicidade elaborados, conseguindo resistir à resposta imunitária desencadeada pelo hospedeiro (Happonen *et al.* 1985). Provavelmente, um dos mecanismos que mais contribui para a evasão destas espécies é a sua organização em biofilmes, nos quais ficam ligadas a um substrato orgânico ou inorgânico e rodeadas por uma matriz de produtos microbianos extracelulares, nos quais a resistência aos agentes antimicrobianos e à resposta imunitária é bastante superior à que é encontrada nas formas planctónicas (Costerton *et al.* 1999).

Contudo, na maioria das situações, a patologia periapical pós-tratamento resulta da persistência de microrganismos na região apical do sistema de canais radiculares (Lin *et al.* 1991). Até mesmo os canais tratados segundo um elevado padrão de qualidade apresentam, no final da preparação, áreas da sua superfície não tocadas pelos instrumentos (Siqueira *et al.* 1997a), as quais podem conter microrganismos e tecido necrótico que pode servir de substrato ao seu crescimento (Nair *et al.* 2005), ainda que radiograficamente as suas obturações canales apresentem um aspecto compacto e homogéneo (Kersten *et al.* 1987).

Um dos estudos que ajudou a esclarecer as razões da persistência de lesões periapicais assintomáticas após tratamento endodôntico convencional, bem executado, foi publicado por Nair e colaboradores e resultou da observação, em microscopia de luz e electrónica, de biópsias contendo a lesão e a porção apical da raiz. Os casos foram inicialmente tratados com isolamento absoluto, controlados microbiologicamente antes do tratamento, confirmando a contaminação de todos os canais, e submetidos a necropulpectomia com materiais e

técnicas similares às do estado actual da arte. Os casos tiveram um “follow up” clínico e radiográfico que variou entre os 4 e os 10 anos. Durante este período 10% dos dentes apresentaram lesões periapicais persistentes assintomáticas e foram submetidos a cirurgia apical. Das 9 biópsias realizadas, 6 apresentaram microrganismos no interior dos canais, 4 com bactérias e 2 com fungos. A presença de bactérias no interior dos canais foi detectada por microscopia de luz em apenas uma das amostras, sendo os restantes casos identificados somente após o estudo de cortes seriados analisados por microscopia electrónica. Dos 3 casos onde não foi possível detectar microrganismos, um deles revelou a presença de um granuloma de células gigantes (Nair *et al.* 1990a).

Dois estudos, publicados em 1998, revelaram que a flora microbiana associada a dentes com patologia periapical pós-tratamento endodôntico é bastante diferente da encontrada em dentes sem tratamento canalar prévio, caracterizando-se por um menor número de espécies presentes em cada canal e por um predomínio de bactérias Gram-positivas, com idêntica distribuição entre as facultativas e as anaeróbias obrigatórias (Molander *et al.* 1998; Sundqvist *et al.* 1998). Esta flora é substancialmente diferente da encontrada nas infecções primárias, tipicamente polimicrobianas, com proporções semelhantes de espécies Gram-positivas e Gram-negativas, dominadas pelos anaeróbios obrigatórios. Os microrganismos inicialmente presentes no canal radicular apresentam uma grande variação no que respeita à sua susceptibilidade aos procedimentos terapêuticos, nomeadamente à instrumentação, irrigação e medicação intracanal com antisépticos. A curto prazo a resistência dos microrganismos a estes procedimentos e ao concomitante aumento dos níveis de oxigénio são fundamentais à sua sobrevivência. Contudo, a longo prazo, a capacidade de adaptação a condições ecológicas modificadas, como a súbita diminuição do espaço e nutrientes disponíveis após a obturação, desempenham um papel primordial na selecção das espécies que persistem após a finalização do tratamento (Sundqvist e Figdor 2003).

No entanto, a presença de bactérias no interior dos canais obturados não é condição suficiente para o aparecimento de patologia apical. Para causarem danos no hospedeiro, as mesmas necessitam de atingir quantidades críticas, possuírem patogenicidade e conseguirem comunicação com os tecidos perirradiculares (Sjögren 1996; Peters 2002).

Os dentes com periodontite apical secundária, ou seja, pós-tratamento, apresentam contagens bacterianas mais baixas e menor número de espécies por canal do que dentes com periodontite apical primária. Nestes últimos é frequente encontrar entre 3 a 10 espécies por canal e nos primeiros entre 1 a 3, se nos

reportarmos aos estudos com culturas microbiológicas (Moller 1966; Hancock *et al.* 2001; Peciulienė *et al.* 2001; Pinheiro *et al.* 2003). O cenário passa a ser algo diferente quando a metodologia de estudo envolve a identificação com técnicas de biologia molecular, aumentando o número de espécies identificadas, mas mantendo-se a maior diversidade de espécies nas infecções primárias (Siqueira e Roças 2004; Siqueira e Roças 2005b). Nas secundárias, as espécies anaeróbias facultativas mais frequentemente isoladas são os *Enterococcus*, *Streptococcus* e o *Actinomyces* e a anaeróbia obrigatória é o *Peptostreptococcus*. Algumas espécies difíceis de cultivar, como o *Dialister pneumosintes* e o *Filifactor alocis*, bactérias fastidiosas, foram descobertas recentemente e identificadas com elevada prevalência nesta situação clínica (Siqueira e Roças 2004).

Entre as espécies de microrganismos mais associadas aos casos de periodontite apical pós-tratamento merecem especial destaque o *E. faecalis*, que surge como um patógeno oportunista, e a *C. albicans*, pela frequência com que ambos têm sido isolados e pelo aumento da sua prevalência comparativamente às infecções primárias.

### 3.1.2.1. *Enterococcus faecalis*

Os *Enterococcus* são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, que crescem isoladamente, em pares ou em cadeias. Fazem parte da flora intestinal humana e podem também estar presentes, em menor quantidade e prevalência, no tracto genital feminino ou na cavidade oral (Koch *et al.* 2004), sendo capazes de catabolizar energia a partir de fontes tão diversas como os hidratos de carbono, o glicerol, o lactato, o malato, o citrato, a arginina, a agmatina e vários  $\alpha$ -ceto-ácidos (Stuart *et al.* 2006).

Apesar de ser considerado um habitante comensal da flora oral, a sua prevalência em pacientes sem história prévia de patologia oral é de apenas 1%, enquanto que em pacientes alvo de tratamento ou retratamento endodôntico atinge os 11% (Sedgley *et al.* 2004). A sua presença foi detectada no interior de canais radiculares de dentes com periodontite apical primária e persistente. Contudo, na categoria das infecções primárias está mais associado com as lesões crónicas do que com as agudas, sendo a sua prevalência em torno dos 5% (Siqueira *et al.* 2002), ao passo que em canais radiculares de dentes com patologia periapical persistente oscila, consoante os estudos, entre os 12 e os 77% (Tab. 2) (Hancock *et al.* 2001; Peciulienė *et al.* 2001; Pinheiro *et al.* 2003;

Siqueira e Roças 2004; Kaufman *et al.* 2005). Esta grande variação entre os valores de prevalência encontrados pelos diferentes estudos pode estar relacionada com os métodos de identificação utilizados, com diferenças geográficas ou com a dimensão da amostra.

A constatação da discrepância entre a prevalência em infecções primárias e persistentes levanta a questão de quando e como terão reunido condições para o seu estabelecimento no canal radicular. Apesar de ser necessária mais investigação, é neste momento possível avançar com várias explicações. Em primeiro lugar, o *E. faecalis* pode já estar presente nas infecções primárias mas em muito baixas quantidades, sendo ultrapassado pelos restantes elementos do consórcio microbiano, o que torna difícil a sua detecção. Assim que as condições ambientais se modifiquem pode ganhar vantagem competitiva multiplicando-se e atingindo quantidades detectáveis. No entanto, estudos não dependentes de culturas, realizados por técnicas de biologia molecular, demonstraram uma prevalência 10 vezes superior em canais com patologia pós-tratamento (Siqueira e Roças 2004) do que em infecções primárias (Siqueira *et al.* 2002), o que não favorece esta hipótese. Outra explicação possível, sugerida na literatura, é a sua chegada ao canal por falhas na cadeia asséptica durante o tratamento, ou a entrada entre múltiplas sessões de tratamento (Peciulienė *et al.* 2001). Nesse sentido aponta um estudo no qual canais com restaurações provisórias impróprias, deixados com a cavidade de acesso aberta ou que foram alvo de mais de 10 sessões de tratamento, apresentam uma prevalência de *E. faecalis* significativamente mais elevada (Siren *et al.* 1997). Além disso, foi recentemente demonstrado que esta espécie possui uma bomba de prótons na sua parede celular, capaz de canalizar prótons para o seu interior e acidificar o citoplasma, permitindo deste modo a sua sobrevivência em meios de elevada alcalinidade e justificando assim a resistência que apresenta à medicação intracanal com hidróxido de cálcio (Evans *et al.* 2002). Também foi demonstrada a sua sobrevivência quando sujeito a elevadas concentrações salinas e de sais biliares (Tendolkar *et al.* 2003). Por último, esta espécie é particularmente resistente a flutuações da disponibilidade de nutrientes e durante períodos de privação longos consegue entrar num estado metabólico básico do qual pode sair logo que as condições do meio se modifiquem (Figdor *et al.* 2003).

Entre os factores de virulência desta espécie destacam-se a substância de agregação, proteínas da superfície membranar, a gelatinase, a toxina citolisina, a produção de superóxido extracelular, os polissacarídeos capsulares e a resistência genética aos antibióticos, que lhe facilitam a invasão dos tecidos, a adesão às células do hospedeiro e à matriz extracelular, bem como um efeito de imunomodulação e lesão mediada por toxinas (Stuart *et al.* 2006).

Tabela 2 - Resultados de diferentes estudos microbiológicos em canais de dentes com periodontite apical pós-tratamento

Estudo	Método de identificação	Dimensão da amostra	Presença de microrganismos positiva	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
(Moller 1966)	Cultura	264	45%	28%	3%
(Waltimo <i>et al.</i> 1997)	Cultura	96	72%		7%
(Sundqvist <i>et al.</i> 1998)	Cultura	54	44%	38%	8%
(Molander <i>et al.</i> 1998)	Cultura	100	68%	32%	3%
(Peciulienė <i>et al.</i> 2001)	Cultura	40	83%	64%	18%
(Hancock <i>et al.</i> 2001)	Cultura	54	63%	30%	3%
(Pinheiro <i>et al.</i> 2003)	Cultura	60	85%	53%	4%
(Siqueira e Roças 2004)	PCR	22	100%	77%	9%
(Fouad <i>et al.</i> 2005)	PCR	37	n. a.	22%	n. a.
(Kaufman <i>et al.</i> 2005)	PCR	58	90%	12%	n. a.
(Egan <i>et al.</i> 2002)	Cultura	25	n. a.	n. a.	16%
(Sedgley <i>et al.</i> 2006)	Cultura	48	54,5%	10,2%	n. a.
	PCR	48	100%	79,5%	

n. a. – não aplicável.

As percentagens de *E. faecalis* e *C. albicans* apresentadas são em relação ao número de canais com cultura positiva.

Uma particularidade com impacto no potencial patogénico desta espécie prende-se com a sua capacidade de invadir os túbulos dentinários, confirmada *in vivo* (Peters *et al.* 2001) e *in vitro* (Ørstavik e Haapasalo 1990; Peters *et al.* 2000), particularmente efectiva na presença de soro sanguíneo (Love 2001) e na ausência de imunoglobulina G (Love 2002). Esta capacidade tem sido explorada em modelos experimentais de infecção *in vitro* dos túbulos dentinários, com vista à avaliação de estratégias de irrigação e medicação intracanal para a sua erradicação. Utilizando a metodologia anteriormente referida, foi demonstrada a superioridade do gel de clorhexidina em relação ao hidróxido de cálcio, na eliminação do *E. faecalis* dos túbulos dentinários de dentina bovina (Lenet *et al.* 2000), sendo a mesma corroborada por outro estudo do mesmo grupo realizado em

dentina humana (Basrani *et al.* 2003). Além disso, a utilização prévia de um gel de clorexidina a 2%, como medicação intracanal, foi efectiva na diminuição da colonização subsequente dos túbulos dentinários por esta espécie, confirmando a actividade antimicrobiana residual presente no canal após a remoção da clorexidina, ou seja, a sua substantividade antimicrobiana (Basrani *et al.* 2002).

### 3.1.2.2. *Candida albicans*

Os estudos microbiológicos de lesões apicais pós-tratamento endodôntico demonstraram que os fungos podem ser isolados do interior dos canais dos dentes envolvidos, em monocultura ou associados a bactérias, em percentagens que variam dos 3 aos 18% das amostras (Molander *et al.* 1998; Peciulienė *et al.* 2001). A grande maioria dos fungos isolados pertence ao género *Candida*, sendo a *C. albicans* a espécie mais comum. Outras espécies que têm sido isoladas e descritas na literatura são a *C. glabrata*, a *C. guilliermondii*, a *C. inconspicua*, o *Geotrichum candidum* e o *Sacharomyces cerevisiae* (Debelian *et al.* 1995; Waltimo *et al.* 1997).

A avaliação de 10 molares extraídos com lesões periapicais, por observação em microscopia electrónica de varrimento, revelou a presença de fungos no interior dos canais de 4 deles, sendo visíveis na forma de leveduras ou até mesmo, num dos casos, apresentando hifas (Sen *et al.* 1995).

Os modelos de infecção dos túbulos dentinários *in vitro* demonstraram a afinidade da *C. albicans* para invadir a dentina (Sen *et al.* 1997) e a sua capacidade para penetrar nos túbulos dentinários, muito embora seja inferior à que é apresentada pelo *E. faecalis* (Waltimo *et al.* 2000).

A avaliação da susceptibilidade da *C. albicans* ao hidróxido de cálcio, num modelo *in vitro*, revelou que a sua capacidade de resistência é elevada, sendo necessário um período de incubação de 16 horas para eliminar 99,9% das unidades formadoras de colónias (CFU). A resistência demonstrada por esta espécie é igual ou superior à encontrada para o *E. faecalis* em condições semelhantes (Waltimo *et al.* 1999). Por outro lado, o hipoclorito de sódio e a clorexidina mostraram ser efectivos na sua eliminação (Sen *et al.* 1999) e, noutro estudo do mesmo grupo, comparando os antissépticos anteriores, alguns antifúngicos e a solução aquosa de EDTA a 17%, verificou-se que esta última se destacou positivamente, pela sua maior capacidade de eliminar quer a estirpe laboratorial quer os microrganismos isolados a partir da cavidade oral (Sen *et al.* 2000).

### 3.2. Microinfiltração coronária

As infecções intrarradiculares associadas a patologia periapical pós-tratamento endodôntico podem ser persistentes, quando são o resultado de microrganismos que resistiram aos procedimentos de antissépsia canalar, ou secundárias, quando a entrada dos mesmos ocorre durante ou após a finalização do tratamento endodôntico (Siqueira e Roças 2004).

A microinfiltração coronária tem sido indiciada como uma das principais causas de insucesso do tratamento endodôntico (Saunders e Saunders 1994). Existem diversas situações clínicas que podem estar na origem da exposição da obturação canalar à saliva ou a microrganismos da cavidade oral, a saber: a infiltração através dos materiais de restauração temporária ou permanente; a perda, fractura ou deterioração das restaurações coronárias; a fractura da estrutura dentária; a recidiva de cárie e, o mau isolamento durante a restauração definitiva ou durante a preparação para meios de retenção intrarradicular (Gish *et al.* 1994; Saunders e Saunders 1994). Nestas circunstâncias, os microrganismos podem ter acesso ao canal radicular e, se as condições o permitirem, colonizarem o canal obturado e nele progredirem em direcção apical, estabelecendo-se e libertando produtos de metabolismo capazes de induzir ou perpetuar a patologia periapical.

A contaminação ou recontaminação do sistema de canais radiculares obturados pode ocorrer como resultado da dissolução dos cimentos endodônticos pela saliva ou por enzimas bacterianas, ou ainda, por degradação da interface entre a parede canalar e o cimento ou entre este e o material de núcleo (Wu 1993; Tay *et al.* 2005; Tay e Pashley 2007). Além disso, a obturação tridimensional do sistema canalar raramente é alcançada e a existência de hiatos ou bolhas, não detectáveis radiograficamente, podem facilitar a rápida recontaminação (Kersten *et al.* 1987).

Têm sido publicados inúmeros estudos de avaliação da microinfiltração ao longo do canal radicular obturado, *in vitro*, utilizando para este fim diversos modelos experimentais. Entre as várias metodologias utilizadas referimos a infiltração linear de corantes, tipo tinta da china (Pollard *et al.* 1990) ou azul de metileno (Porkaew *et al.* 1990), a infiltração de radioisótopos (Matloff *et al.* 1982), de lipopolissacarídeo (Trope *et al.* 1995) ou a utilização de um sistema de pressão negativa que permita medir a passagem de fluidos através do canal obturado (Wu 1993). No entanto, a relevância destes modelos tem sido questionada e criticada tendo em conta que: na presença de bolhas de ar não há progressão dos corantes; a medição da infiltração linear só permite obter uma informação semi-quantitativa (a medição da infiltração volumétrica seria cientificamente

mais rigorosa); e o tamanho das moléculas utilizadas provavelmente não tem correlação com o dos agentes biológicos relevantes para o desenvolvimento de patologia apical (Wu e Wesselink 1993).

Outros modelos de avaliação da microinfiltração *in vitro* utilizaram microrganismos e demonstraram que, independentemente do material e técnica de obturação canalar utilizados, os canais expostos ficam rapidamente contaminados (Swanson e Madison 1987; Torabinejad *et al.* 1990; Khayat *et al.* 1993). A exposição de canais obturados à saliva, sem restauração coronária, permitiu a sua total contaminação em menos de 30 dias, independentemente da técnica de obturação utilizada (Khayat *et al.* 1993). Com um desenho experimental semelhante, mas submetendo as amostras à exposição a duas espécies bacterianas distintas, observou-se que 50% dos canais inoculados com *S. epidermidis* se encontravam contaminados ao fim de 19 dias, e quando inoculadas com *P. vulgaris* o mesmo valor se atingiu ao fim de 42 dias (Torabinejad *et al.* 1990). Ao testarem, em condições semelhantes, canais com material de obturação removido (para simular a preparação para meios de retenção intrarradicular) e inoculados com culturas mistas de duas espécies bacterianas anaeróbias, Barrieshi e colaboradores verificaram que ao fim de 84 dias, 80% dos canais ficaram contaminados até à região apical (Barrieshi *et al.* 1997). Noutro estudo, com avaliação histológica e de penetração de corantes, foram comparados quanto à sua capacidade de resistir à penetração de saliva, dentes com obturação canalar, com ou sem restauração provisória, tendo-se verificado um aumento significativo da infiltração em dentes sem restauração coronária, sobretudo ao fim de 3 meses. Os autores consideraram estes dados clinicamente relevantes e preconizaram que todos os canais radiculares obturados expostos à saliva, por um período superior a 3 meses, devem ser alvo de retratamento, dada a elevada probabilidade do material de obturação canalar se encontrar contaminado (Magura *et al.* 1991).

No entanto, alguns estudos que procuraram correlacionar os resultados dos testes de microinfiltração *in vitro* com a resposta tecidual observada *in vivo*, não conseguiram estabelecer um paralelismo entre ambos os modelos, o que faz questionar a relevância clínica dos resultados observados *in vitro* (Pitt Ford 1983; Madison *et al.* 1987; Madison e Wilcox 1988).

Para ajudar a clarificar este tema foi desenvolvido um modelo experimental animal, com o cão Beagle, para avaliar o impacto clínico da microinfiltração coronária. O desenho da investigação teve como base a realização do tratamento endodôntico com obturação canalar e a posterior inoculação da câmara pulpar de alguns dentes com flora oral autóloga, de modo a simular a infiltração coronária. Quatro meses após a inoculação foi terminada a experiência e realizada



a análise histológica, comparando o nível de inflamação periapical dos dentes expostos com os dentes cujas restaurações coronárias se mantiveram intactas, sendo observada inflamação de intensidade grave em 15% dos primeiros e apenas em 4% dos canais não expostos (Friedman *et al.* 1997). Outros estudos posteriores, baseados neste modelo experimental, corroboraram a influência da microinfiltração coronária no desenvolvimento de inflamação periapical (Friedman *et al.* 2000; Shipper *et al.* 2005; Leonardo *et al.* 2007).

Além da evidência científica obtida a partir dos estudos anteriores, em modelo animal, os estudos epidemiológicos transversais também suportam a convicção de que a infiltração coronária tem um impacto negativo no prognóstico do tratamento endodôntico (Ray e Trope 1995; Tronstad *et al.* 2000; Siqueira *et al.* 2005), contudo, o nível de evidência científica destes estudos é considerado baixo.

Um estudo de *coorte* retrospectivo, realizado por Ricucci e colaboradores, avaliou o estado periapical de dentes com tratamento endodôntico portadores de restaurações “intactas” ou deterioradas, e por isso considerados “expostos” ao meio oral. O desenho experimental elaborado preconizou o emparelhamento de dentes com o mesmo diagnóstico pulpar e periapical inicial, com um período de observação idêntico após terminar o tratamento, o mesmo tipo de dente e faixa etária do paciente, bem como uma qualidade da obturação radiograficamente semelhante. Os resultados demonstraram que a probabilidade de encontrar lesão apical num dente “exposto” é 3 vezes superior à de um dente com restauração “intacta”, contudo, a diferença observada entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa. Apesar disso, os autores ressaltam que mantendo-se a tendência observada, uma amostra de 92 pares seria estatisticamente significativa. Salientamos também o seguimento médio de 7 anos após conclusão do tratamento endodôntico e o facto da exposição ao meio oral se ter mantido durante vários meses, verificando-se que dos 55 dentes sem restauração estudados, apenas 10 se encontravam com patologia apical, sendo de referir que 7 já apresentavam essa condição antes da intervenção inicial, o que significa que o aparecimento de lesão apenas se verificou em 3 casos, ou seja, 5% (Ricucci *et al.* 2000). Este estudo evidencia um menor impacto clínico da infiltração coronária do que o sugerido pelos estudos epidemiológicos transversais, sendo possível que esta diferença esteja relacionada com a baixa qualidade técnica dos tratamentos endodônticos avaliados nos mesmos em oposição ao elevado padrão de qualidade registado neste estudo de *coorte*.

Actualmente, existe na literatura da especialidade a convicção acerca do impacto negativo da infiltração coronária no prognóstico do tratamento endodôntico, desconhecendo-se, no entanto, a dimensão real do problema. É por

isso importante enfatizar o papel fundamental do controlo da microinfiltração coronária, através da restauração definitiva adequada e da obturação canalar de elevada qualidade técnica, na optimização do prognóstico do tratamento. Não obstante, algumas questões devem ser clarificadas, nomeadamente o período de exposição a partir do qual se deve recomendar o retratamento do canal, a composição da flora invasora do canal, o impacto da substituição da restauração coronária na flora existente, a quantidade mínima de microrganismos necessária para desencadear lesão apical, a possibilidade de desenvolver novos materiais de obturação canalar com maior eficácia clínica e de dotar a dentina de propriedades farmacológicas que dificultem a reentrada de microrganismos no sistema de canais radiculares.

## **II – Trabalho Experimental**

---



## Trabalho experimental

A revisão bibliográfica efectuada permite-nos identificar a microinfiltração coronária e a subsequente entrada de microrganismos no sistema de canais radiculares como um factor adverso no prognóstico do tratamento endodôntico. Os materiais e as técnicas de obturação canulares disponíveis na actualidade são incapazes de prevenir a sua ocorrência de forma previsível, pelo que propomos uma abordagem diferente, que parte da hipótese que a substantividade antimicrobiana induzida na dentina pela clorohexidina, já provada *in vitro*, pode diminuir a infiltração de microrganismos ao longo de canais radiculares obturados.

### Objectivo

O objectivo deste trabalho é avaliar, *in vitro* e *in vivo*, a eficácia de um gel de clorohexidina a 2%, aplicado como medicação intracanal por um período de 7 dias, na prevenção da microinfiltração coronária após a obturação.

### Hipótese do estudo *in vitro*

A incidência de contaminação nos espécimes medicados com gel de clorohexidina, durante 7 dias, será menor do que nos canais obturados sem medicação intracanal prévia.

### Hipótese do estudo *in vivo*

A incidência de inflamação periapical nos canais medicadas com gel de clorohexidina, entre consultas, será menor do que nos canais preparados e obturados numa única sessão.

No modelo experimental *in vitro* a hipótese foi testada frente a 3 materiais de obturação diferentes: a) um cimento endodôntico extensamente estudado e com alargada utilização clínica, o Pulp Canal Sealer® (Kerr – SybronEndo); b) um cimento endodôntico recentemente introduzido no mercado, o GuttaFlow® (Coltène/Whaladent) e c) um material recém desenvolvido, o Resilon™/Epiphany™ (Pentron Clinical Technologies). Este último material representa um novo paradigma na obturação de canais radiculares, substituindo a utilização de guta-percha por um polímero à base de policaprolactona (Resilon™), que é utilizado como material de núcleo, associado a um cimento endodôntico (Epiphany™), à base de resinas de metacrilato, com o qual tem possibilidade de estabelecer ligação química. Os espécimes foram preparados e previamente medicados com o gel de clorhexidina a 2% ou obturados imediatamente com cada um dos materiais anteriores. Posteriormente foram submetidos à inoculação coronária de bactérias (*Enterococcus faecalis*) ou fungos (*Candida albicans*), por um período de 80 dias.

No estudo experimental *in vivo* a hipótese foi testada frente a um único material de obturação, o Resilon™/Epiphany™. Esta escolha prendeu-se sobretudo com a necessidade de manter o tamanho da amostra dos diferentes grupos acima do nível mínimo exigido pelo planejamento estatístico. Além disso optamos por utilizar o material mais recentemente desenvolvido, por representar uma nova abordagem na área da obturação canalar. O modelo permitiu avaliar a biocompatibilidade dos materiais utilizados, bem como a sua eficácia clínica perante a ocorrência de microinfiltração coronária.

Este trabalho foi também elaborado tendo em vista procurar uma possível correlação entre os resultados do modelo experimental *in vitro* e *in vivo*.

## **A) Estudo experimental *in vitro***

Durante os últimos anos têm sido publicados um número crescente de estudos de microinfiltração *in vitro*. O modelo experimental com infiltração linear de corantes (tinta da china ou azul de metileno), tem sido o mais utilizado pela comunidade científica. No entanto, problemas como o aprisionamento de ar no interior do material de obturação ou diferenças no coeficiente de difusão das soluções utilizadas, podem perturbar a progressão dos corantes e contribuir para a falta de reprodutibilidade dos resultados. Para ultrapassar estas limitações foram introduzidas algumas modificações, nomeadamente o recurso a radioisótopos ou a utilização de pressão negativa. Não obstante, estes modelos passaram a ser criticados, fundamentalmente, pela falta de relevância clínica da infiltração de substâncias de baixo peso molecular, que provavelmente não apresentam características de progressão semelhantes aos agentes biológicos responsáveis pelo desenvolvimento de periodontite apical.

Mais recentemente, foram introduzidos modelos experimentais nos quais se utilizaram o lipopolissacarídeo bacteriano ou microrganismos para testar *in vitro* a resistência dos materiais de obturação à microinfiltração coronária.

O modelo experimental utilizado neste estudo consiste num sistema de suspensão do dente, no qual a região apical fica submersa num meio de cultura estéril e encerrada num recipiente hermético, a câmara inferior, ficando a parte coronária do dente em contacto com o exterior, a câmara superior, permitindo assim o acesso e a inoculação de microrganismos durante todo o período experimental (Fig. 17). Este modelo foi inicialmente desenvolvido por Torabinejad e

colaboradores (Torabinejad *et al.* 1990) e posteriormente modificado e utilizado noutros estudos de microinfiltração de microrganismos *in vitro* (Barrieshi *et al.* 1997; Barthel *et al.* 2000; Padachey *et al.* 2000).

## 1. Objectivos

O principal objectivo deste estudo foi a avaliação da eficácia da medicação intracanal com um gel de clorohexidina a 2%, durante uma semana, na diminuição da microinfiltração coronária ao longo de canais radiculares obturados.

Como objectivos secundários visámos:

- a) avaliar a resistência de diferentes materiais de obturação à microinfiltração coronária; e
- b) analisar em que medida o tipo de microrganismo inoculado, *Enterococcus faecalis* ou *Candida albicans*, modifica ou não os resultados observados.



## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Selecção e preparação dos dentes

Utilizaram-se 140 dentes humanos, com uma única raiz, essencialmente recta, extraídos recentemente, com os ápices completamente desenvolvidos e sem cáries radiculares. Foram incluídos na amostra apenas dentes extraídos por motivos periodontais ou ortodônticos e obtido consentimento informado dos pacientes para a sua posterior utilização com fins experimentais. Antes do início da preparação para a fase experimental foram curetados para remover os tecidos moles e cálculos, sendo posteriormente conservados numa solução de cloramina T a 0,5%.

Os dentes foram depois seccionados a nível coronário, uniformizando o seu comprimento para 16 mm, com recurso a uma broca cilíndrica diamantada, de turbina, refrigerada a água (Fig. 15).

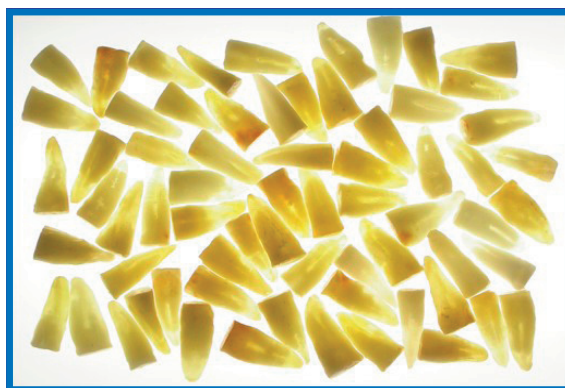


Figura 15 – Amostra de raízes utilizadas no estudo, seccionados com o tamanho padronizado de 16 mm a partir do ápice.

O acesso canal e o comprimento de trabalho foram estabelecidos visualmente, 1 milímetro aquém da emergência de uma lima K 15 (Zipperer) pelo *foramen* apical. Após o alargamento cervical com brocas de Gates-Glidden®, números 2 a 4 (Maillefer-Dentsply), os canais foram preparados com limas do sistema HeroShaper® (MicroMega®), numa sequência corono-radicular descendente até ao comprimento de trabalho, atingindo o alargamento apical o número 35 e a conicidade de 4%. A permeabilidade apical foi mantida ao longo da preparação através da utilização de uma lima K 25 introduzida até ser possível a sua visualização directa ao nível do *foramen*. Durante a preparação canal e

utilizada como solução de irrigação NaOCl a 2,5 % e a irrigação final pré-obturaç o foi feita com a seguinte seq encia: 3ml de NaOCl a 2,5%, seguida de 3 ml de EDTA a 17% durante 30 segundos e, finalmente 3 ml de soro fisiol gico. Os dentes foram manipulados e mantidos em gazes humedecidas para evitar a desidrata o durante toda a fase de prepara o canalar.

## 2.2. Prepara o do gel de clorohexidina a 2%

O gel foi preparado em farm cia de manipula o a partir da dilui o de uma solu o de digluconato de clorohexidina a 20% (Sigma Scientific) em  gua desionizada esterilizada, seguida da adi o de metilcelulose USP 4000 (1gr/100ml)(Fig. 16), misturadas num agitador magn tico por um per odo de 5 minutos, conservada protegida da luz e   temperatura de 5 C at    sua utiliza o, que decorreu dentro de uma semana ap s prepara o.

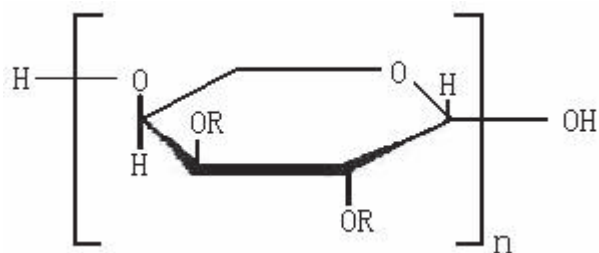


Figura 16 - F rmula qu mica da metilcelulose.

## 2.3. Defini o dos grupos controlo e teste

Ap s a prepara o canalar, os dentes foram divididos aleatoriamente em 8 grupos, 6 de teste com 10 dentes (n=10) e 2 de controlo com 5 dentes cada. Este desenho experimental foi feito em duplicado, de modo a permitir a inocula o coron ria de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, paralela e simultaneamente. Tr s dos grupos de teste (A, B e C) foram obturados imediatamente, enquanto que nos outros 3 grupos (D, E e F) se efectuou a aplica o intracanal do gel de clorohexidina a 2%, durante uma semana, e s  depois se procedeu   obtura o. Todos os grupos de teste foram obturados com t cnica mista, utilizando um cimento endod ntico e um material de n cleo (guta-percha, grupos A, B, D e E ou Resilon<sup>TM</sup>, grupos C e F)(Tab. 3).

Nos grupos A e D a obturação canalar foi realizada com Pulp Canal Sealer® (Kerr) e condensação lateral de guta-percha, com cone mestre número 35 de conicidade 4% e acessórios “medium fine” (Dentsply).

Os grupos B e E foram obturados com GuttaFlow® (Coltène) e um cone único de guta-percha, número 35 e conicidade 4%, cimentado com um suave movimento de bombeamento.

Nos grupos C e F foi aplicada uma gota de Epiphany™ primer, durante 20 segundos, com recurso a uma ponta de papel absorvente. Após este período, absorveram-se os excessos com pontas de papel e inseriu-se o cimento endodôntico Epiphany™; de seguida foi colocado o cone mestre de Resilon™ número 35, conicidade 4% e iniciada a compactação vertical com system B™. No final da compactação vertical foi realizada a fotopolimerização durante 20 segundos, com intensidade de 500mW/cm<sup>2</sup>, com um aparelho Optilux 501 (Demetron/Kerr corporation).

No grupo controlo positivo (grupo P) não foi realizada obturação do canal e no controlo negativo (grupo N) os dentes foram obturados com guta-percha e as raízes totalmente impermeabilizadas através do revestimento da superfície do cimento com aplicação de um sistema adesivo dentinário (AllBond2® dual cure – Bisco).

Nos grupos A, C, D e F os cimentos endodônticos foram introduzidos no canal com recurso a uma espiral de Lentulo número 35 (Maillefer-Dentsply), a rodar à velocidade de 500 rpm, enquanto nos grupos B e E foi utilizado o sistema dispensador proposto pelo fabricante.

Após a obturação os dentes foram mantidos, durante uma semana, numa incubadora à temperatura de 37°C e 98% de humidade de modo a permitir a reacção de presa/polimerização antes da manipulação experimental subsequente.

Tabela 3 – Identificação e caracterização dos grupos controlo negativo, controlo positivo e de teste

Grupo	n	CHX 2%	Obturação canalar	Permeabilidade apical
<b>N</b>	5	-	Guta-percha (GP)	-
<b>P</b>	5	-	-	+
<b>A</b>	10	-	GP+Pulp Canal Sealer®	+
<b>B</b>	10	-	GP+GuttaFlow®	+
<b>C</b>	10	-	Resilon™+Epiphany™	+
<b>D</b>	10	+	GP+Pulp Canal Sealer®	+
<b>E</b>	10	+	GP+GuttaFlow®	+
<b>F</b>	10	+	Resilon™+Epiphany™	+

## 2.4. Montagem do modelo experimental

Foram microabrasionadas com partículas de óxido de alumínio (Microetcher®-Jelenko Dental Health) agulhas de irrigação Endo-Eze 18G® (Ultradent products) e esterilizadas em autoclave.

Cada agulha foi introduzida através do septo de silicone de um frasco de vidro de 10 ml. Seguidamente removeram-se 4 mm de material de obturação na zona cervical da raiz, com recurso a brocas de Peeso 4 e 5, de modo a criar uma área para cimentação da agulha na entrada coronária do canal. Após condicionamento com ácido ortofosfórico a 35%, foram cimentadas as agulhas com recurso ao sistema adesivo dentinário (AllBond2® – Bisco) aplicado em modo de dupla polimerização. Além deste procedimento, revestiu-se parcialmente a superfície das raízes com duas camadas de verniz, deixando os dois milímetros apicais expostos, excepto no grupo N, no qual o ápice também foi recoberto.



Figura 17 – Montagem experimental com a agulha Endo-Eze 18G® cimentada na parte coronária da raiz e suspensa pelo septo de silicone.

O conjunto formado pelo septo de silicone, a agulha e o dente foi introduzido no frasco, onde a raiz ficou suspensa (Fig. 17). Este conjunto e as tampas dos frascos foram embalados em manga mista, esterilizados em óxido de etileno à temperatura de 30°C e armazenados em estufa a 37°C e 98% de humidade durante 48 horas.

## 2.5. Cultura dos microrganismos

O *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e a *Candida albicans* (F-72) foram previamente cultivados em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) e *Sabouraud dextrose*

(SDA), respectivamente, e incubados durante 48 horas. Depois prepararam-se suspensões de *E. faecalis* em tubos rosqueáveis contendo 5 ml de BHI, de acordo com o padrão de concentração de 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  células/ml), sendo a densidade óptica das suspensões ajustada pela medição da absorvância do espectrofotômetro a 800 nm. O inóculo de *C. albicans* foi preparado a partir da centrifugação para separação dos microrganismos do meio de cultura. Os fungos foram isolados e lavados em solução tamponada de fosfato (PBS), para remoção de impurezas, e o "pellet" final ressuspensionado para a contagem dos microrganismos em câmara de Neubauer. A partir do número de microrganismos presentes na solução foram feitas diluições de modo a ajustá-la à concentração de  $1,5 \times 10^8$  fungos/ml.

## 2.6. Preparação das amostras para inoculação

Injectaram-se 4 ml de meio de cultura (*BHI* ou *SDA* consoante o microrganismo a inocular), numa câmara de fluxo laminar, no interior do frasco, através da perfuração do septo de silicone com uma agulha 27 G (Ultradent). Os 4 mm apicais da raiz ficaram submersos em meio de cultura (Fig. 18). A tampa do frasco foi depois colocada, apertada e tornada hermética com recurso a cola de silicone. Finalmente o sistema foi incubado durante 48 horas, a 37°C, para confirmar se as condições de esterilidade da câmara inferior do modelo experimental se mantiveram, o que se caracterizou por ausência de turbidez no final do período de incubação (Fig. 19).



Figura 18 – Injecção do meio de cultura na câmara inferior de modo a submergir os 4 mm apicais da raiz.

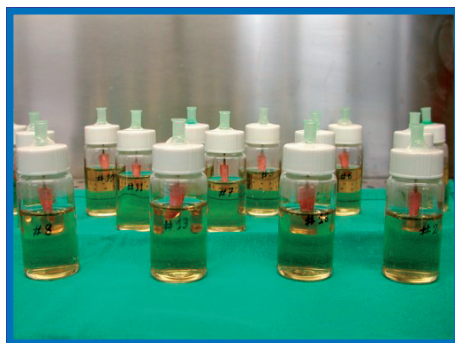


Figura 19 – Incubação das amostras durante 48 horas, para confirmação das condições de esterilidade, antes do início da inoculação.

## 2.7. Inoculação

No interior de uma câmara de fluxo laminar, com uma agulha hipodérmica de insulina, foram inoculados 100  $\mu$ l da suspensão de microrganismos na câmara pulpar de cada amostra (Fig. 20). A cada 4 dias foi realizada nova inoculação com microrganismos recém-cultivados e as amostras incubadas a 37°C.



Figura 20 – Inoculação coronária dos microrganismos com agulha hipodérmica de insulina.

O meio de cultura foi examinado, diariamente, por um período de 80 dias, para detectar turbidez (Fig. 21), indicadora da entrada de microrganismos na região apical do canal. Ao ser observada contaminação do meio, foi registrado o

número da amostra e a data. Além disso, foi realizada uma amostragem do meio contaminado e a cultura em meio sólido incubada a 37°C durante 24h (Fig. 22). As colónias foram examinadas ao microscópio para confirmar semelhança morfológica com o *Enterococcus faecalis* ou com *Candida albicans* de modo a excluir a possibilidade de contaminação cruzada por outro microrganismo que não o inoculado experimentalmente. Realizaram-se também testes de identificação bioquímica API 20 (Biomerrux) para reconhecimento do *E. faecalis* (Fig. 23) e o teste API ID 32 C (Biomerrux) para identificação da *C. albicans*.

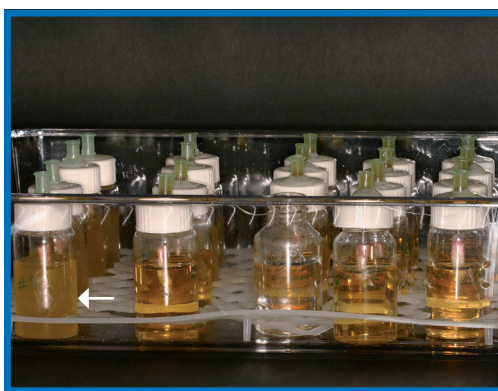


Figura 21 – Inspeção das amostras para detecção de sinais de contaminação, evidenciada pela turbidez do meio de cultura (seta branca).

Todo o processo de inoculação, controlo da contaminação e registo das datas em que a mesma ocorreu, foi realizado de forma “cega” por um investigador.



Figura 22 – Cultura de *E. faecalis* em meio sólido para confirmação morfológica da compatibilidade das colónias com a estirpe inoculada.





Figura 23 – Teste de identificação bioquímica API 20 (Biomerrux) para reconhecimento do *E. faecalis*.

## 2.8. Métodos estatísticos

A análise foi feita em ambiente Windows® XP, com recurso ao programa estatístico SPSS 14.0.

A ocorrência de turbidez no meio de cultura e o tempo decorrido até à mesma se verificar foi comparado entre os diferentes grupos e estudado pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. Diferenças significativas entre os grupos nas curvas de Kaplan-Meier foram avaliadas pelo teste de Log Rank para um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

Posteriormente efectuaram-se comparações para a variável medicação intracanal com clorhexidina, independentemente do material de obturação, e, no caso de serem detectadas diferenças, estudaram-se os grupos entre si. Foi também estudada a variável material de forma independente e avaliadas as diferenças entre os materiais associados ou não à medicação com CHX.



### 3. Resultados

O número de espécimes de cada grupo que apresentaram contaminação, bem como a data da sua ocorrência, estão apresentados na tabela 4 para as amostras inoculadas com *E. faecalis* e na tabela 5 para a inoculação com *C. albicans*.

Nos grupos controlo positivo a contaminação do meio ocorreu de forma rápida e consistente, verificando-se que ao fim de 2 dias todas as amostras do grupo apresentaram contaminação (Fig. 24). O plaqueamento em meio sólido e os testes de identificação permitiram confirmar que a contaminação ocorreu, em todos os casos, pelos microrganismos inoculados. Por outro lado, nos grupos controlo negativo não ocorreu qualquer contaminação ao longo de todo o período experimental.

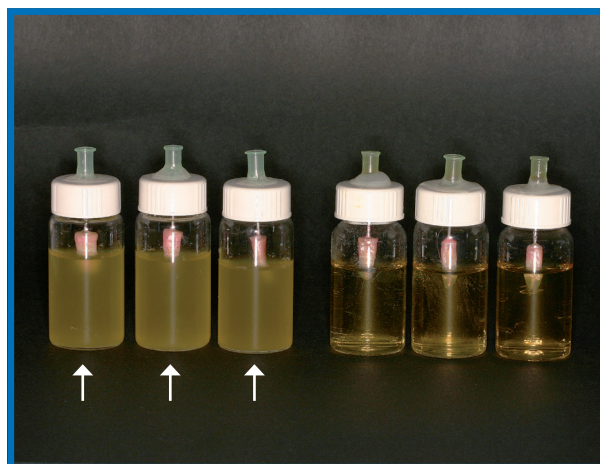


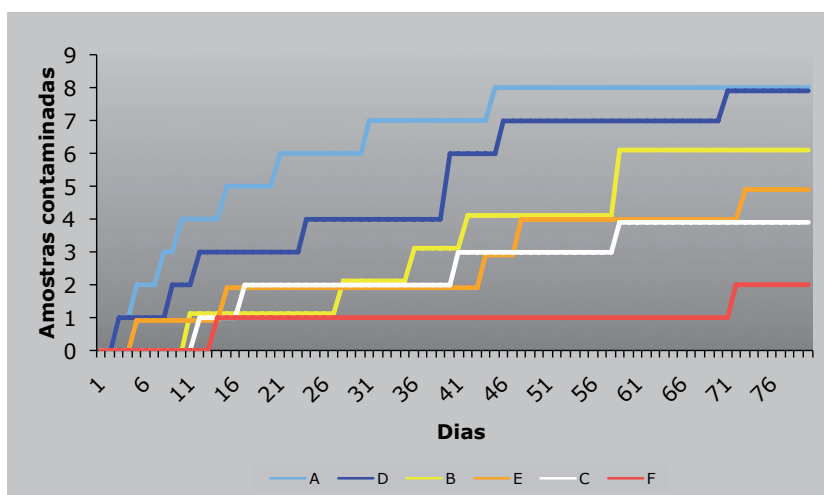
Figura 24 – Do lado esquerdo da imagem, amostras do controlo positivo apresentando turbidez indicadora de contaminação da câmara inferior (setas brancas).

#### **Inoculação com *Enterococcus faecalis***

Nas amostras inoculadas com *E. faecalis*, verificou-se que os grupos sujeitos a medicação com clorhexidina, considerados globalmente, mostraram um atraso e/ou diminuição do número de espécimes contaminadas, comparativamente com os mesmos grupos não-medicados. No entanto, a diferença observada entre ambos não é estatisticamente significativa ( $p=0,3554$ ).

Tabela 4 – Tratamento efectuado e período decorrido até à identificação de contaminação das amostras inoculadas com *E. faecalis*

Grupo	n	CHX 2%	Obturação canalar	Permeabilidade apical	Contaminação	
					Espécimes	Tempo (dias)
<b>N</b>	5	-	Guta-percha (GP)	-	0	
<b>P</b>	5	-	-	+	5	1(x5)
<b>A</b>	10	-	GP+Pulp Canal Sealer®	+	8	3,5,8,10, 15,21,31,45
<b>B</b>	10	-	GP+GuttaFlow®	+	6	11,28,36,42, 59(x2)
<b>C</b>	10	-	Resilon™+Epiphany™	+	4	12,17,41,59
<b>D</b>	10	+	GP+Pulp Canal Sealer®	+	8	3,9,12,24, 40(x2),46,71
<b>E</b>	10	+	GP+GuttaFlow®	+	5	5,15,44,48, 73
<b>F</b>	10	+	Resilon™+Epiphany™	+	2	14,72

Gráfico 1 - Evolução do número de amostras contaminadas com *E. faecalis*

Estudados de forma independente, os vários grupos medicados com cloroxidina a 2%, evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre eles ( $p=0,0135$ ). Analisadas estas diferenças, o Resilon™/Epiphany™ mostrou-se superior ao Pulp Canal Sealer® ( $p=0,005$ ), contudo, em relação ao GuttaFlow®, o primeiro não apresenta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,1736$ ).

Avaliados os materiais de obturação canalar, independentemente da medicação com cloroxidina, verificou-se existir uma diferença estatisticamente

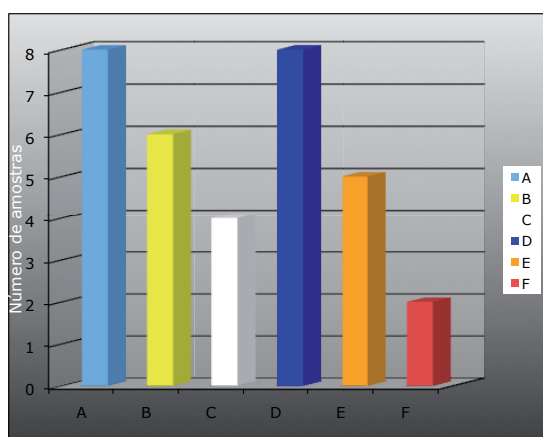


Gráfico 2 – Número de amostras contaminadas com *E. faecalis* no final do período experimental

significativa entre eles ( $p=0,0009$ ). Analisada esta diferença, constatou-se que o Resilon™/Epiphany™ ( $p=0,0005$ ) e o GuttaFlow® ( $p=0,0270$ ) apresentaram contaminação mais tardia e em menor número do que o Pulp Canal Sealer®. Os resultados obtidos com o GuttaFlow® ou com Resilon™/Epiphany™ não apresentam diferença estatística significativa ( $p=0,1269$ ).

### Inoculação com *C. albicans*

Para as amostras inoculadas com *C. albicans*, considerada apenas a variável medicação intracanal com CHX a 2% ou não, com os diferentes materiais de obturação agrupados, verificou-se um atraso e diminuição da infiltração, estatisticamente significativo, nos grupos onde foi utilizada a CHX ( $p=0,0396$ ).

Comparando os vários materiais de obturação, desagrupados ou agrupados de acordo com o factor medicação intracanal, não se verificou em nenhum dos casos diferenças estatisticamente significativas entre eles.

Tabela 5 – Tratamento efectuado e período decorrido até à identificação de contaminação das amostras inoculadas com *C. albicans*

Grupo	n	CHX 2%	Obturação canal	Permeabilidade apical	Contaminação	
					Espécimes	Tempo (dias)
<b>N</b>	5	-	Guta-percha (GP)	-	0	
<b>P</b>	5	-	-	+	5	1(x4), 2
<b>A</b>	10	-	GP+Pulp Canal Sealer®	+	6	3,5,7,10, 12,21
<b>B</b>	10	-	GP+GuttaFlow®	+	8	3,5,7,11(x2), 30,44,72
<b>C</b>	10	-	Resilon™+Epiphany™	+	5	3,34,58,65, 68
<b>D</b>	10	+	GP+Pulp Canal Sealer®	+	3	3,11,58
<b>E</b>	10	+	GP+GuttaFlow®	+	5	3,11,16, 33(x2)
<b>F</b>	10	+	Resilon™+Epiphany™	+	3	4,32,72

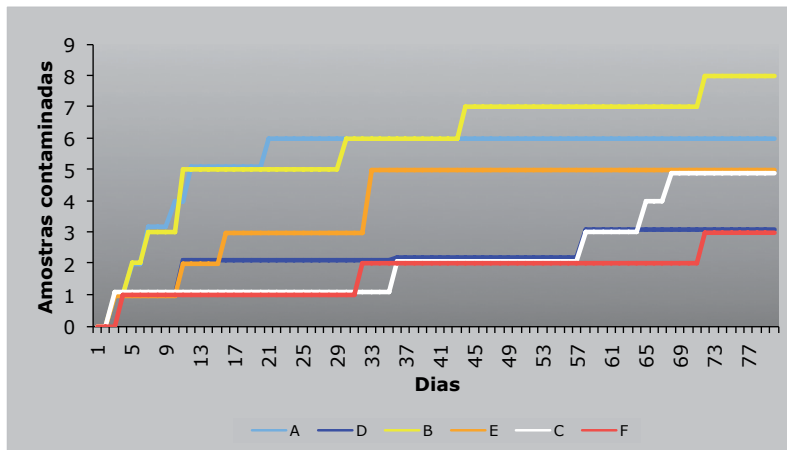


Gráfico 3 – Evolução do número de amostras contaminadas com *C. albicans*

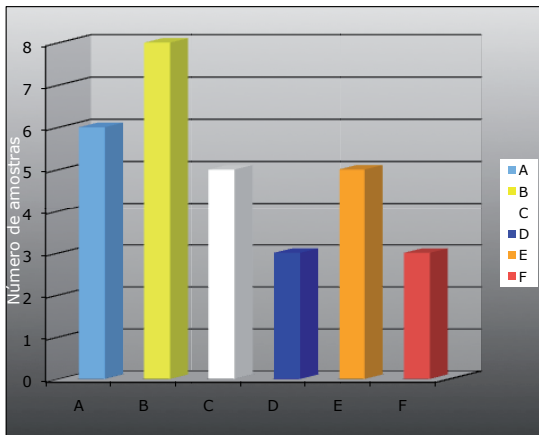


Gráfico 4 – Número de amostras contaminadas com *C. albicans* no final do período experimental

Os melhores resultados observados, com ambos os microrganismos inoculados, foram verificados nos casos de medicação intracanal com gel de clorohexidina a 2%, durante uma semana, seguido da obturação canal com Resilon™/Epiphany™. Embora esta superioridade tenha sido observada perante a inoculação de ambos os microrganismos, apenas foi estatisticamente significativa no modelo de inoculação com *E. faecalis*.

Para testar se houve ou não influência do tamanho da amostra nos resultados obtidos, realizou-se o exercício estatístico de duplicar o tamanho da mesma, mantendo os mesmos parâmetros, não se verificando alteração dos resultados, pelo que concluímos que a resposta dos grupos foi diferente perante cada um dos microrganismos (Gráf. 5).

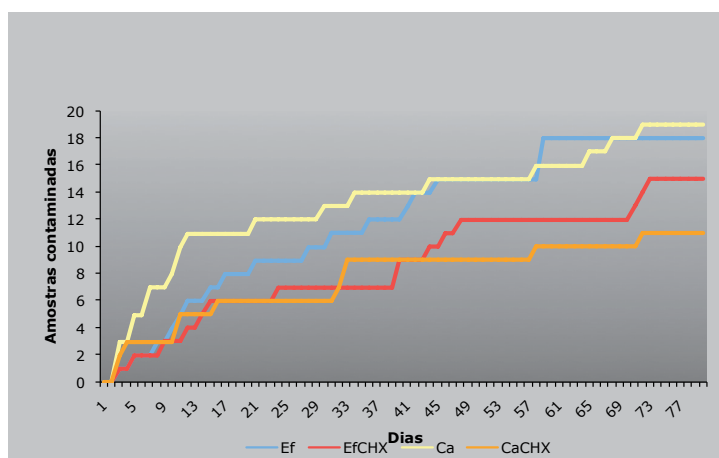


Gráfico 5 – Comparação global da contaminação ocorrida em amostras medicadas com gel de CHX a 2% (EfCHX e CaCHX) ou não medicadas (Ef e Ca), inoculadas com *E. faecalis* (Ef e EfCHX) ou com *C. albicans* (Ca e CaCHX)

Verificou-se também uma tendência geral para o aumento do tempo necessário para a progressão dos microrganismos em direcção apical nos canais expostos ao gel de CHX a 2%.

No final do período de inoculação, aos 80 dias, 55% das amostras expostas ao *E. faecalis* e 50% das submetidas à *C. albicans* evidenciaram contaminação do meio de cultura na câmara inferior do modelo.

## 4. Discussão

Os modelos experimentais para avaliação, *in vitro*, da capacidade de diferentes materiais e técnicas de obturação prevenirem a microinfiltração foram desenvolvidos para ultrapassar as dificuldades inerentes aos estudos clínicos, nomeadamente os custos envolvidos, a sua duração, a dificuldade de controlo das variáveis confundentes e os potenciais problemas éticos (Eriksen *et al.* 1988). Os métodos clássicos de avaliação laboratorial baseiam a sua metodologia na infiltração passiva de marcadores, como a tinta da china ou o azul de metileno, ao longo do material de obturação e junto à interface com a parede do canal radicular. Contudo, foi demonstrado que a presença de bolhas de ar acumuladas no interior da massa de material de obturação pode impedir a penetração passiva do marcador, a qual está dependente das forças de difusão e da acção de capilaridade da solução (Oliver e Abbott 1991; Wu e Wesselink 1993). Em geral, quanto maior a dimensão da bolha presente, menor a acção de capilaridade, pelo que a infiltração fica diminuída. Por outro lado, a profundidade de difusão fica dependente da concentração e do coeficiente de difusão da solução do marcador, sendo também este último afectado pelo diâmetro e número das bolhas presentes no interior material de obturação (Pashley 1990), pelo que se sugeriu a remoção do ar aprisionado durante a obturação, por mecanismos de pressão negativa, antes de se submeter as amostras à imersão em corantes (Goldman *et al.* 1989; Spangberg *et al.* 1989). Embora o estabelecimento de condições de pressão negativa tenha sido conseguido (Scott *et al.* 1992), foi também considerado insuficiente para permitir alcançar resultados fiáveis e reproduzíveis com a infiltração de corantes (Peters e Harrison 1992). Outra das limitações apontadas a estes modelos prende-se com a relevância biológica que se pode-

rá atribuir aos resultados de infiltração de moléculas de baixo peso molecular, como os corantes ou os iões, que certamente terão um comportamento bastante díspar do que é evidenciado por moléculas biologicamente activas (Wu 1993).

Para obviar a estas limitações foi introduzido, por Torabinejad e colaboradores, um modelo *in vitro* de infiltração coronária de microrganismos, mais próximo da realidade clínica e da verdadeira etiologia dos insucessos (Torabinejad *et al.* 1990), tendo sido modificado e comparado com os modelos clássicos de infiltração de corantes, permitindo alcançar resultados considerados biologicamente mais significativos (Barrieshi *et al.* 1997; Barthel *et al.* 1999). No modelo originalmente proposto foram estudadas duas estirpes bacterianas, o *S. epidermidis* e o *P. vulgaris*, verificando-se contaminação de 50% das amostras ao fim de 19 dias para o primeiro microrganismo e a fim de 42 dias para o segundo (Torabinejad *et al.* 1990). Noutro estudo com metodologia idêntica, as amostras foram inoculadas durante 50 dias com *P. aeruginosa*, um microrganismo de pequena dimensão e motilidade activa que os autores julgavam ter elevado poder de penetração, tendo-se verificado no final do estudo que apenas 7% das amostras ficaram contaminadas (Wu *et al.* 1993). Um estudo mais recente, realizado por De-Deus e colaboradores, com a duração de 70 dias, registou um valor médio de contaminação de 22% das amostras obturadas e inoculadas com uma mistura polimicrobiana de origem salivar (De-Deus *et al.* 2007), o que se aproxima bastante do valor médio observado num modelo idêntico, que foi de 25%, mas no qual se recorreu à inoculação de *E. faecalis* por um período de 90 dias (Padachey *et al.* 2000).

Apesar da falta de padronização e reprodutibilidade deste modelo experimental, em consequência das quais se torna difícil fazer comparações objectivas entre os estudos, a semelhança do desenho experimental dos dois últimos com o modelo por nós usado, leva-nos a questionar acerca das razões justificativas dos valores de contaminação substancialmente mais altos que observámos no final do estudo, concretamente, 50% para as amostras inoculadas com *E. faecalis* e 55% com *C. albicans*. A primeira explicação pode relacionar-se com a padronização do diâmetro do *foramen* por nós efectuado, alargando todas as amostras para o diâmetro de uma lima K 25, enquanto que nos estudos anteriores a permeabilização apical foi realizada apenas com lima K 15. Esta decisão baseou-se no conhecimento dos valores do estudo clássico da anatomia apical, realizado por Kuttler, no qual o menor diâmetro do canal, medido ao nível do limite cimento-dentina-canal, foi em média de 244 µm para os dentes de jovens, dos 18 aos 25 anos, e de 210 µm para o grupo acima dos 55 anos de idade (Kuttler 1955).

Ainda que na clínica seja recomendável a utilização de uma lima K 10 ou k 15 para realizar a permeabilização apical, considerámos mais relevante controlar a variável perímetro apical do canal, estabelecendo uma permeabilização até à emergência visual de um instrumento de 250 µm diâmetro pelo ápice. Outra diferença do nosso trabalho em relação aos estudos anteriores foi o facto de, após cada nova inoculação de microrganismos, as amostras terem sido colocadas num agitador durante 1 minuto, tendo em conta resultados do estudo piloto que mostraram a eficácia deste processo em promover a progressão dos microrganismos. Além disso, foram removidos 4 milímetros da parte cervical da obturação canalar, de modo a permitir a adequada cimentação da agulha Endo-Eze para montagem do modelo experimental, o que condicionou um comprimento final da obturação canalar de apenas 11 milímetros, o que é ligeiramente inferior ao tamanho da obturação das amostras testadas nos estudos anteriores. A remoção de material de obturação canalar, com a finalidade de preparar espaço para meios de retenção intrarradicular, está associada a um aumento da infiltração directamente proporcional à redução sofrida no comprimento total da obturação (Metzger *et al.* 2000). A inoculação coronária de uma mistura de bactérias anaeróbias estritas, *in vitro*, em dentes com preparação canalar para núcleo intrarradicular, durante 90 dias, demonstrou capacidade para contaminar por completo a obturação canalar de 80% das amostras (Barrieshi *et al.* 1997).

A conservação dos dentes por um curto período antes da experiência e a utilização de uma solução de cloramina T, tiveram como objectivo a manutenção da composição inorgânica e orgânica da dentina o mais intacta possível, nomeadamente a estrutura da malha de colagénio, de modo a não interferir com a formação da camada híbrida, que se esperava alcançar com a utilização de materiais de obturação baseados na química dos polímeros de polimetilmetacrilato, como é o caso do sistema Epiphany™/Resilon™.

De modo a causar o menor distúrbio possível dos materiais de obturação canalar, os espécimes foram esterilizados em óxido de etileno à temperatura de 30°C. Este processo já tinha sido utilizado com sucesso noutros estudos (Khayat *et al.* 1993; Chailertvanitkul *et al.* 1996; Barthel *et al.* 1999), contudo, levantou-se a dúvida se poderia interferir com a actividade antimicrobiana residual esperada na dentina exposta ao gel de clorohexidina. Para clarificar esta questão, submeteram-se discos de dentina humana ao tratamento com o mesmo gel, durante uma semana, e posteriormente foram esterilizados, sendo depois transferidos para placas de Petri, com uma sementeira de *E. faecalis* sobre um meio de cultura sólido, constatando-se a existência de um halo de inibição de dimensões equivalentes aos discos de dentina não sujeitos ao processo de esterilização.



A clorohexidina a 2% pode ser utilizada como medicação intracanal na forma de gel ou líquido (Delany *et al.* 1982; Barbosa *et al.* 1997). Neste estudo optámos pela forma de gel dado existirem evidências científicas anteriores do seu bom desempenho (Komorowski *et al.* 2000; Lenet *et al.* 2000; Basrani *et al.* 2002; Basrani *et al.* 2003; Gomes *et al.* 2003; Rosenthal *et al.* 2004; Dametto *et al.* 2005; Gomes *et al.* 2007). A inexistência de uma formulação comercialmente disponível, à data da realização do trabalho experimental, levou-nos a preparar o gel em farmácia de manipulação, utilizando como veículo a metilcelulose, um composto hidrossolúvel, fácil de remover do canal com soluções aquosas (Ferraz *et al.* 2001). O gel foi preparado e acondicionado num recipiente protegido da exposição directa à luz, tendo sido utilizado como medicação intracanal até uma semana após a sua produção, garantindo assim a manutenção da sua concentração efectiva.

Os controlos negativos foram introduzidos para assegurar que a câmara inferior do modelo experimental não se encontrava susceptível à contaminação directa por microrganismos, com origem no exterior do frasco ou provenientes da infiltração ao longo da superfície externa da raiz. A sua não contaminação ao longo do período experimental valida o modelo montado e a capacidade do sistema All-Bond 2® e das 2 camadas de verniz selarem de forma eficaz o exterior da raiz. A aplicação do verniz foi realizada também em todos os outros grupos, de modo a impermeabilizar o exterior da raiz e garantir que a contaminação, constatada na câmara inferior, tenha ocorrido em consequência da passagem dos microrganismos ao longo de todo o canal radicular, através do *foramen* apical, e não por outro trajecto mais curto, eventualmente proporcionado pela existência de canais laterais ou acesórios, que comprometeriam a pretendida padronização do comprimento das amostras.

Neste estudo optámos por realizar a inoculação com *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* por quatro razões principais:

- 1) são microrganismos que têm sido frequentemente isolados a partir de canais de dentes portadores de periodontite apical persistente (Molander *et al.* 1998; Sundqvist *et al.* 1998; Hancock *et al.* 2001; Peciulienė *et al.* 2001; Pinheiro *et al.* 2003; Siqueira e Roças 2004; Kaufman *et al.* 2005; Sedgley *et al.* 2006);
- 2) são fáceis de cultivar e crescem rapidamente em laboratório (Haapasalo *et al.* 2000; Waltimo *et al.* 2000; Portenier *et al.* 2005; Davis *et al.* 2007);

- 3) têm revelado mecanismos de resistência à medicação intracanal com hidróxido de cálcio e susceptibilidade à clorhexidina (Ørstavik e Haapasalo 1990; Waltimo *et al.* 1999; Sen *et al.* 2000; Basrani *et al.* 2002; Evans *et al.* 2002; Basrani *et al.* 2003); e
- 4) foram já usados com sucesso em estudos anteriores idênticos (McDougall *et al.* 1999; Padachey *et al.* 2000; Waltimo *et al.* 2000).

Os resultados demonstram que nenhum dos materiais/técnicas de obturação canalar estudados são capazes de prevenir por completo a microinfiltração coronária *in vitro*, neste modelo experimental, ao longo do período de 80 dias. As técnicas mistas de obturação do sistema de canais radiculares são actualmente as mais utilizadas e defendidas, preconizando a utilização de um material de núcleo, considerado impermeável, juntamente com um cimento endodôntico que faz a ligação entre este e a parede de dentina. É reconhecido que os pontos fracos da obturação, por onde é mais provável ocorrer microinfiltração, resultem da ocorrência de falhas adesivas, isto é, na interface dentina/cimento ou cimento/material de núcleo, ou, por outro lado, de falhas coesivas, ou seja, no interior do próprio cimento (Wu 1993), pelo que se tem procurado desenvolver novos materiais capazes de minimizar as lacunas existentes nos materiais clássicos.

Entre os 3 materiais em estudo, o material clássico de referência, o Pulp Canal Sealer® foi o que apresentou piores resultados, o que se encontra em concordância com outros estudos de microinfiltração (Kontakiotis *et al.* 1997; Wu *et al.* 2004; Xu *et al.* 2005; De-Deus *et al.* 2007; Bouillaguet *et al.* 2008). Uma das razões potenciais poderá residir nos baixos valores de ligação à dentina encontrados para os cimentos endodônticos à base de óxido de zinco-eugenol (Saleh *et al.* 2002; Tagger *et al.* 2002), ou pode também estar relacionada com o facto de ter sido o único material, neste estudo, espatulado manualmente, existindo indícios de que este procedimento permite o aparecimento de uma maior quantidade de poros e vacúolos na massa do cimento endodôntico, enfraquecendo por isso as suas propriedades físico-químicas (Mutal e Gani 2005).

A infiltração do GuttaFlow® foi menor do que a verificada com o Pulp Canal Sealer®, o que é consistente com estudos anteriores (Brackett *et al.* 2006; Bouillaguet *et al.* 2008). A utilização de uma técnica de cone único poderia ser apontada como promotora de uma qualidade final de obturação inferior às outras duas (compactação lateral e System B™), visto que pode implicar a necessidade de utilizar um maior volume de cimento endodôntico e, por conseguinte, aumentar a probabilidade de se formarem poros ou de ocorrerem alterações

dimensionais após a presa (Kontakiotis *et al.* 1997), capazes de prejudicarem a capacidade de selamento (Wu *et al.* 1994). Contudo, devemos ter em conta que o conceito de obturação com cone único foi recentemente revisitado (Wu *et al.* 2006), tendo sido encontrados resultados similares entre a técnica do cone único e a compactação vertical de guta-percha aquecida (Brackett *et al.* 2006). Salientamos o facto do volume de cimento endodôntico utilizado no nosso estudo ter sido reduzido, dado que foram utilizados cones de guta-percha com conicidade 4%, isto é, calibrados de acordo com preparação canalar efectuada. Além disso, ao contrário da maioria dos cimentos endodônticos, o GuttaFlow® sofre uma ligeira expansão de polimerização, o que pode contribuir para a sua eficiente selagem canalar (Hammad *et al.* 2008).

A superioridade dos resultados obtidos pelo sistema Epiphany™/Resilon™ aplicado pela técnica de compactação vertical com o System B™ é corroborada por estudos anteriores (Shipper *et al.* 2004; Stratton *et al.* 2006; Tunga e Bodrumlu 2006). Todavia, neste momento não existem provas científicas suficientes para afirmar de forma segura esta superioridade, pois um número significativo de estudos não encontrou diferenças entre este novo material e os materiais clássicos (Biggs *et al.* 2006; Onay *et al.* 2006; Pitout *et al.* 2006; Raina *et al.* 2007). Além disso, a ultramorfologia revelou que este sistema permite a infiltração na interface entre o cimento e a parede de dentina, ou seja, ao longo da zona híbrida (Tay *et al.* 2005), e quando avaliado 16 meses após a obturação, o material parece sofrer degradação e perda da capacidade para prevenir a microinfiltração de forma mais substancial do que o clássico AH Plus™/guta-percha, o que constitui um indício de deterioração da camada híbrida ao longo do tempo (Paque e Sirtes 2007). Estes resultados são compatíveis com o que observámos no nosso estudo, sobretudo nas amostras inoculadas com *Candida albicans*, onde a contaminação dos espécimes obturados com Epiphany™/Resilon™ ocorreu num período mais tardio do que com os outros materiais. Por outro lado, também o principal componente do material de núcleo Resilon™, a policaprolactona, demonstrou susceptibilidade à hidrólise alcalina e enzimática (Tay *et al.* 2005; Tay *et al.* 2005; Hiraishi *et al.* 2007), o que poderá comprometer a sua eficácia clínica em situações de exposição directa ao meio oral.

Os grupos medicados com o gel de clorhexina a 2%, durante uma semana, mostraram menos contaminação do que os seus correspondentes não-medicados, quer para a inoculação com o *E. faecalis*, quer para a *C. albicans*. Não obstante a diferença encontrada foi estatisticamente significativa apenas

para este último microrganismo. A melhoria dos resultados, independente dos materiais de obturação utilizados, indicia que a actividade antimicrobiana da clorohexidina, libertada a partir da parede de dentina, seja o factor responsável pela menor microinfiltração verificada. Os nossos resultados são corroborados por outros estudos, que utilizaram o modelo de infecção dos túbulos dentinários, onde se demonstrou a indução de substantividade antibacteriana na dentina radicular, após medicação intracanal com um gel de clorohexidina a 2%, durante uma semana, em dentina bovina (Komorowski *et al.* 2000; Lenet *et al.* 2000) e humana (Basrani *et al.* 2002). O efeito antimicrobiano evidenciando nestes trabalhos estendeu-se até 21 dias após a sua remoção do canal radicular. Porém, Rosenthal e colaboradores, ao utilizarem um gel de clorohexidina a 2%, durante 10 minutos antes da obturação canal, verificaram que mesmo após um período de armazenamento de 12 semanas, os extractos de dentina removidos demonstraram libertação de clorohexidina, quantificável pela análise de espectrofotometria ultravioleta. As concentrações presentes evidenciaram ainda eficácia antimicrobiana contra o *E. faecalis* (Rosenthal *et al.* 2004).

Por outro lado, existe apenas um estudo publicado com o modelo da dupla câmara, com inoculação de *S. epidermidis*, que compara a medicação intracanal com hidróxido de cálcio, o Ledermix® e um gel de clorohexidina a 5%. Os resultados obtidos foram favoráveis ao hidróxido de cálcio, não se evidenciando a actividade antimicrobiana substantiva da clorohexidina (Barthel *et al.* 2000). Contudo, a experiência decorreu por um período total de 12 meses, não se verificando contaminação de nenhuma das amostras durante os 3 primeiros, surgindo diferenças entre os grupos apenas a partir do 4º mês. Salientamos que não estão publicadas provas científicas de manutenção da actividade antimicrobiana residual da clorohexidina para além das 12 semanas, o que pode justificar este pior desempenho a partir deste período. Além disso, o estudo não faz qualquer referência a cuidados específicos para não expôr as amostras a agentes que possam causar instabilidade e perda de eficácia antimicrobiana da clorohexidina.

As propriedades fisico-químicas e de difusibilidade da clorohexidina catapultam-na para uma posição privilegiada como medicação para usar entre consultas (Basrani *et al.* 2004), permitindo a sua chegada *in vitro* até profundidades de dentina humana na ordem dos 200 µm, após uma semana de aplicação (Basrani *et al.* 2003), ou até 300 µm (Ørstavik e Haapasalo 1990; Vahdaty *et al.* 1993) a 400 µm em dentina bovina (Gomes *et al.* 2003). A sua posterior

libertação gradual a partir dos túbulos dentinários em direcção ao sistema de canais radiculares, nomeadamente para a interface dentina/cimento endodôntico, poderá ter sido um factor decisivo no atraso e redução da infiltração observada neste modelo experimental.

O condicionamento da dentina radicular com clorohexidina também demonstrou capacidade para aumentar *in vitro* a força de adesão dos sistemas adesivos à dentina (Erdemir *et al.* 2004) e inibir a degradação da malha de colagénio, limitando a deterioração da zona híbrida induzida pelas proteases do hospedeiro, nomeadamente as metaloproteinases da matriz (Hebling *et al.* 2005; Carrilho *et al.* 2007).

Todos os métodos de estudo têm as suas limitações e um estudo *in vitro* nunca poderá representar fielmente as condições da situação *in vivo*. É necessário entrar em consideração com os inúmeros factores que interactuam na situação clínica e que não podem ser contemplados no modelo experimental. Como exemplo destas limitações salientamos apenas um aspecto, que se prende com o tipo de microrganismos a que a obturação canalar tem de resistir num e noutro caso. Enquanto no laboratório temos a possibilidade de controlar a qualidade e a quantidade dos microrganismos, expondo os canais a culturas puras, na clínica os materiais ficam sujeitos a uma flora polimicrobiana, cuja patogenicidade é bastante superior. A avaliação da susceptibilidade do *E. faecalis* à clorohexidina encontra-se, para além de outros factores, dependente do estado fisiológico de crescimento em que é testado. As células bacterianas em fase de crescimento exponencial, no qual são habitualmente utilizadas para avaliar em laboratório a eficácia dos antissépticos, apresentam uma susceptibilidade superior às células em fase de crescimento estacionário, e estas últimas ainda são superadas pelas que se encontram em estado "starved"<sup>2</sup>, cuja resistência pode ser 1.000 a 10.000 vezes superior às primeiras (Portenier *et al.* 2005). O canal radicular bem obturado apresenta condições ecológicas condicionadas por uma enorme escassez de nutrientes, com nichos muito específicos para colonizar, associado a uma grande diversidade de microrganismos e à consequente facilidade de adquirirem genes que confirmam resistência adicional aos antissépticos. Por esta razão, é mais provável encontrar na realidade clínica microrganismos com um

<sup>2</sup> Estado "starved" – Estado que corresponde à fase estacionário tardia da curva de crescimento bacteriano, caracterizado pela acentuada diminuição da disponibilidade de nutrientes no meio.

perfil de resistência aos antissépticos superior ao apresentado nos testes de avaliação *in vitro*, pelo que em concentrações idênticas poderão não alcançar clinicamente a mesma eficácia antimicrobiana.

Por conseguinte, a extrapolação dos resultados de um estudo *in vitro* para a situação clínica deve ser feita com as devidas precauções.

Por outro lado, nos estudos *in vivo*, não é possível controlar as variáveis com os níveis de objectividade conseguidos *in vitro*, isto é, a possibilidade de estudar o efeito de cada factor isoladamente, neutralizando interferências com os demais, bem como o desenvolvimento de condições experimentais reproduzíveis em diferentes momentos e por diferentes investigadores.

Em relação a este último aspecto, as normativas ISO 6876 (2001) "Dental root canal sealing materials" e a especificação ANSI/ADA nº57 (2006) "Endodontic sealing material", que definem as condições em que devem ser realizados os testes físicos e mecânicos dos cimentos endodônticos, vieram dar um importante contributo nesse sentido. Não obstante, estas normativas são omissas em relação aos testes de microinfiltração, o que tem facilitado o desenvolvimento de modelos experimentais muito heterogêneos. Embora a falta de padronização e reprodutibilidade, entre os vários testes publicados, tornem qualquer comparação entre estudos num exercício com elevado grau de incerteza, a comunidade científica reconhece a sua importância no estabelecimento de um "ranking" entre os materiais/técnicas avaliadas dentro de um determinado estudo, devendo a relação encontrada ser testada noutros modelos experimentais, por forma a conferir consistência aos resultados encontrados.

A optimização da resistência à microinfiltração coronária, verificada neste estudo, no qual se utilizou medicação intracanal com gel de clorohexidina, justificaram o prosseguimento da avaliação da sua eficácia num modelo experimental *in vivo*, capaz de reproduzir de forma mais completa as condições encontradas durante a sua aplicação clínica.

## **B) Estudo experimental *in vivo***

A biocompatibilidade dos materiais é um factor de grande relevância no campo das ciências biomédicas. Em Conferência de Consenso da Sociedade Europeia de Biomateriais, a biocompatibilidade de um material foi definida como a capacidade de induzir uma resposta apropriada do receptor numa localização específica.

Entre as directivas de maior divulgação e que servem de referência à comunidade científica internacional na avaliação biológica dos materiais destacamos as normas ISO/TR 7495 (1997) "Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials" e mais detalhadamente a regulamentação ISO 10993 "Biological evaluation of medical devices", que definem as condições e a bateria de testes para avaliação dos materiais dentários, estabelecendo 3 patamares sequenciais de avaliação:

1. Testes iniciais, de citotoxicidade em culturas celulares;
2. Testes secundários, que englobam o teste de sensibilização e irritação, a toxicidade sistémica por via oral, a mutagenicidade e a implantação subcutânea e óssea;
3. Testes de uso clínico, em que a aplicação dos materiais é efectuada em condições similares à aplicação final, em modelos animais como o furão, o cão, o macaco ou ensaios clínicos em humanos.

Esta regulamentação salvaguarda os interesses humanos uma vez que a padronização dos testes conduz ao lançamento no mercado de produtos clínicos seguros. Simultaneamente respeita as práticas de Bem-Estar animal ao possibilitar a redução do número de animais de experiência utilizados nos testes *in vivo*.

Neste contexto decidimos elaborar o estudo *in vivo*, seguindo o modelo experimental proposto por Friedman e colaboradores, que permite não só avaliar a biocompatibilidade como também a eficácia funcional dos materiais utilizados durante o tratamento endodôntico (Friedman *et al.* 1997), por forma a testar a hipótese anteriormente avaliada *in vitro*, ou seja, a capacidade da medicação intracanal com clorohexidina diminuir a microinfiltração coronária em dentes obturados com o Resilon™/Epiphany™.

## 1. Objectivos

O principal objectivo deste estudo foi avaliar a eficácia da medicação intracanal com um gel de clorohexidina a 2%, durante uma semana, na prevenção do desenvolvimento de inflamação periapical pós-tratamento endodôntico.

Como objectivos secundários pretendemos:

- 1) Avaliar a biocompatibilidade da medicação intracanal com clorohexidina e do material de obturação Epiphany™/Resilon™;
- 2) Avaliar o impacto da microinfiltração coronária, promovida pela exposição da cavidade de acesso à saliva, no desenvolvimento de inflamação periapical;
- 3) Estudar a reacção histológica dos tecidos periapicais aos materiais de obturação canal extravasados a partir do canal radicular.



## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Amostra

No desenvolvimento deste trabalho experimental, com a autorização nº 520/000/2004 da Direcção Geral de Veterinária - Direcção de Serviços de Meios de Defesa da Saúde, Bem-estar e Alimentação Animal, foram utilizadas seis cadelas, de raça Beagle, nascidas e criadas no *Servicio Centralizado de Animales de Experimentación* da Universidade de Córdoba.

### 2.2. Manutenção dos animais

O estado de saúde geral dos animais, à chegada ao biotério da Estação Zootécnica Nacional, foi avaliado por veterinários com experiência prévia e qualificação na área da experimentação animal. Excluída qualquer patologia aguda ou crónica, entraram num período de quarentena, com observação diária, durante uma semana. Todos os animais tiveram um período de 3 meses de ambientação às novas instalações antes de qualquer intervenção cirúrgica.

No momento da primeira intervenção experimental os animais tinham cerca de dois anos de idade e pesos compreendidos entre os 11 e os 13 quilogramas (Tab. 6).

Os animais foram mantidos em condições laboratoriais apropriadas de ciclos de luz e temperatura. Foram alojados em estruturas individuais metálicas, com as dimensões adequadas à espécie, identificadas em relação ao estudo e ao número do animal.

Tabela 6 – Identificação, idade e peso dos animais no início do estudo

Nº do cão	Nº de identificação	Data de nascimento	Data da 1ª intervenção	Idade (meses)	Peso antes da 1ª intervenção (Kg)
1	985100010097801	10/02/2002	07/06/2004	27	13,0
2	985100009755129	17/02/2002	16/06/2004	27	11,8
3	985120012842664	11/04/2002	21/06/2004	26	12,0
4	985120013743266	10/09/2002	28/06/2004	23	12,0
5	985100010396378	10/10/2002	05/07/2004	20	12,1
6	985100010402981	10/10/2002	06/07/2004	20	12,0

### **2.3. Anestesia e sedação**

Todas as intervenções foram realizadas no bloco operatório do Centro de Cirurgia Experimental da Estação Zootécnica Nacional, pólo do Instituto de Tecnologia Biomédica.

As duas primeiras intervenções, em cada um dos animais, foram realizadas sob anestesia geral e em condições de assepsia imprescindíveis à boa prática de Endodoncia. O protocolo de anestesia incluiu a pré-medicação tranquilizante, com administração intramuscular de acepromazina (Calmivete®, Vetoquinol, 0,05 mg/kg), meia hora antes da intervenção. De seguida foi cateterizada a veia radial com *Abbot cath* nº22, e efectuada a indução anestésica com administração endovenosa de tiopental sódico (Tiopental Braun, 10 mg/kg). Foi mantida a perfusão venosa com lactato de Ringer e, depois, realizada a intubação com sonda traqueal nº6 de modo a permitir a manutenção da anestesia através da administração de uma mistura de oxigénio com 1 a 2% de isoflurano (Isoflu®, Abbot). Logo após a indução anestésica, e no decurso de toda a intervenção, foi realizada a monitorização do ritmo cardíaco, da pressão sanguínea sistólica e diastólica, do electrocardiograma e dos índices de saturação de oxigénio (com oxímetro). Os movimentos respiratórios foram controlados visualmente.

As intervenções subsequentes, de duração aproximada de 30 minutos e por não exigirem a realização de isolamento absoluto do campo operatório, foram realizadas com sedação do animal. Esta foi atingida após administração intramuscular de uma combinação de tiletamina/zolazepam (Zoletil 50®, Virbac, 7mg/kg).

### **2.4. Definição dos grupos controlo positivo, negativo e experimental**

Em cada um dos animais, o tratamento endodôntico foi realizado em 10 pré-molares (Fig. 25), birradiculares, sob estritas condições de assepsia, utilizando um total de 120 canais (Tab.7).

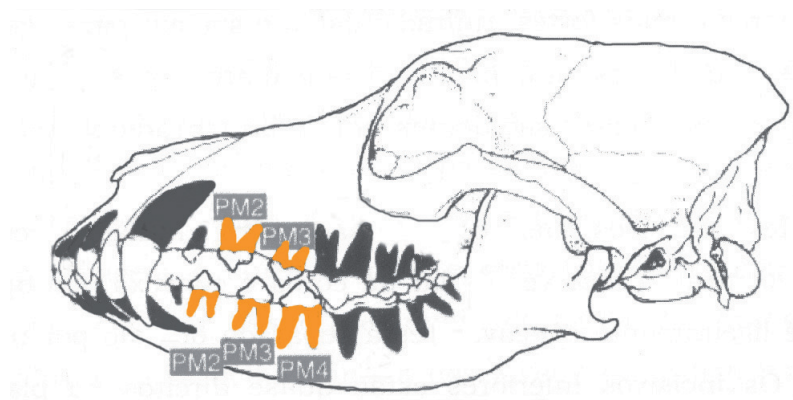


Figura 25 – Diagrama dentição do cão com identificação dos dentes sujeitos a tratamento.

Tabela 7 – Síntese do protocolo dos grupos controlo positivo, controlo negativo e teste

Grupo	Número de raízes	Tratamento	Exposição e inoculação
<b>Controlo positivo</b>	12	Preparação sem obturação canalar	Sim
<b>Controlo negativo</b>	18	Grupo 1 - Resilon™ / Epiphany™	Não
	18	Grupo 2 - Clorohexidina+ Resilon™ / Epiphany™	
<b>Teste</b>	36	Grupo 1 - Resilon™ / Epiphany™	Sim
	36	Grupo 2 - Clorohexidina+ Resilon™ / Epiphany™	

Dos 4 pré-molares maxilares (segundo e terceiro de cada quadrante), 1 segundo pré-molar serviu como controlo positivo e os restantes 3 foram atribuídos ao grupo controlo negativo. No controlo positivo foi removida a polpa e os canais preparados, mas não foi realizada a obturação canalar, sendo no entanto efectuada a restauração coronária. No controlo negativo, os canais foram preparados e obturados numa sessão, ou preenchidos com medicação intracanal e obturados uma semana depois. Após este tratamento foram realizadas restaurações coronárias, de elevada qualidade, em condições de assepsia, que foram mantidas intactas até ao final do estudo.

Os 6 pré-molares mandibulares (segundo, terceiro e quarto de cada quadrante) foram submetidos ao protocolo dos grupos teste. Este incluiu a preparação e obturação de acordo com o protocolo seguido no grupo controlo negativo, no entanto, três semanas depois de finalizado o tratamento, as restaurações coronárias foram removidas e a câmara pulpar ficou directamente exposta ao meio oral (Fig. 26).

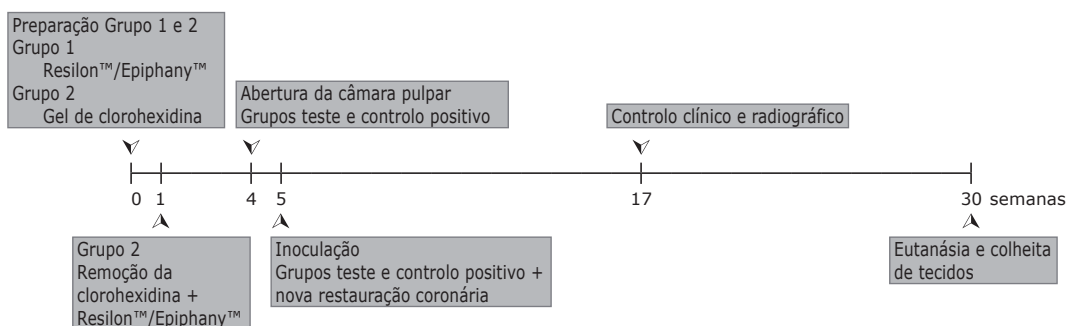


Figura 26 – Diagrama das etapas do protocolo experimental.

## 2.5. Aleatorização

A completa aleatorização da amostra não foi possível devido ao desenho inicial da experimentação que requer uma distribuição assimétrica entre os grupos controlo positivo, negativo e experimental. Além disso, dado que em cada um dos grupos foram testados um procedimento e o seu controlo, emparelhados no mesmo dente, e que a anatomia radicular dos prémolares tem a particularidade de apresentar uma raiz mesial de maior dimensão que a distal, optou-se pela aleatorização em blocos. Esta foi efectuada pelo lançamento de um dado, de modo a definir a raiz que seria alvo do procedimento experimental nos quadrantes ímpares, invertendo-se a ordem nos quadrantes pares, de modo a possibilitar a obtenção final do mesmo número de raízes mesiais e distais submetidas ao procedimento experimental e controlo, nos grupos controlo negativo e teste, em cada um dos animais.

## 2.6. Protocolo operativo

Antes da realização do tratamento endodôntico, foram efectuadas radiografias periapicais dos dentes, a destartarização com instrumentos manuais e o polimento com pasta profiláctica Zircon® (Zircon Produits Dentaires SA).

Após o isolamento absoluto com recurso a grampo (w9, Hygienic), arco metálico e dique de silicone (Non-Latex Dental Dam - Hygienic Coltène/Whaledent) (Fig. 27), desinfectou-se o dente e todo o conjunto com uma solução de iodopovidona a 10% (Iodolab-Labesfal) (Fig. 28). A cúspide central do dente foi ligeiramente reduzida em oclusal e realizou-se a cavidade de acesso coronário, de orientação mesio-distal, com broca diamantada Endo Access™ (Maillefer/Dentsply) montada em turbina e refrigerada por água destilada (Fig. 29).

A identificação da entrada e a exploração inicial do canal foi efectuada com lima K 10 (MicroMega). O comprimento de trabalho foi definido com base na sensação táctil obtida com a introdução de lima K 15 até ao limite da sua progressão apical. De seguida, o canal foi instrumentado com recurso ao sistema de preparação mecanizado Hero 642® (MicroMega), com utilização das limas Endoflare, 30/06 e 30/04 (Figs. 30, 31 e 32), numa sequência corono-radicular, com uma velocidade de 300 rotações por minuto e binário controlado a 5 N/cm. Após medição do diâmetro apical do canal, por sensação táctil, com lima K manual, o limite apical foi subsequentemente alargado até lima k 40, 45, 50, 55 ou 60 (Fig. 33), consoante os dentes, com base no critério de instrumentar 2 números acima do diâmetro apical inicial determinado para cada canal.

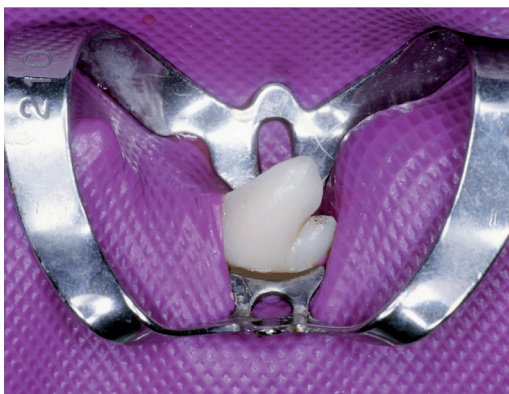


Figura 27 – Isolamento absoluto do dente com dique de silicone.



Figura 28 – Antissépsia do campo operatório com solução de iodopovidona a 10%.

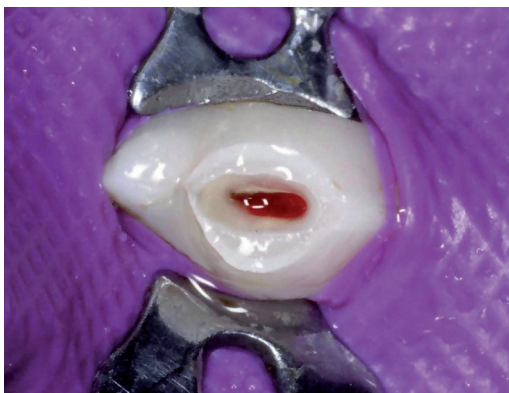


Figura 29 – Cavidade de acesso coronário de longo eixo mesio-distal.



Figura 30 – Remoção da polpa do terço cervical da raiz.



A irrigação foi realizada de modo intermitente, entre cada instrumento, com uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (Serviços de Farmácia - Hospitais da Universidade de Coimbra), num volume total que perfiz os 9 ml por canal. Na fase inicial da instrumentação mecânica a cavidade de acesso coronário foi repleta de um gel lubrificante à base de EDTA e peróxido de carbamida numa base hidrossolúvel (Glyde™ File Prep - Maillefer-Dentsply)(Fig. 31).

No final da preparação, os canais foram submetidos ao protocolo de irrigação que incluiu: 3 ml de hipoclorito de sódio a 2,5%, seguido de 2 ml de EDTA a 17% (Elargisseur canalaire EDTA - Produits Dentaires), durante 30 segundos, neutralizado pela irrigação final com 3 ml de soro fisiológico (Fig. 34). Seguidamente foram inseridas no canal pontas de papel absorvente esterilizadas (Absorvent Paper Points - Dentsply), para remover a solução de irrigação remanescente (Fig. 35) e preparar o canal para a obturação (Fig. 36).



Figura 31 – Utilização do lubrificante Glyde™ File Prep.

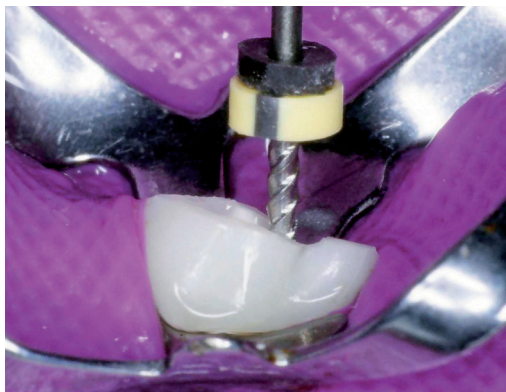


Figura 32 – Preparação canalar com o sistema Hero 642®.

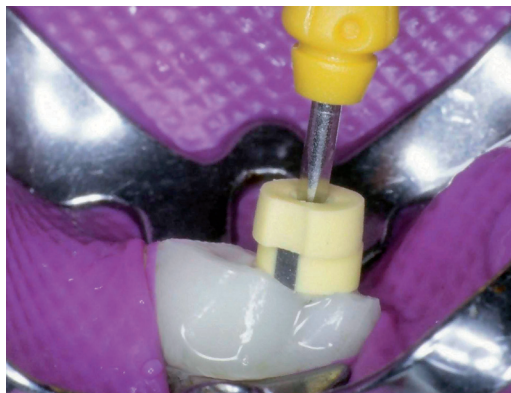


Figura 33 – Finalização da preparação apical com instrumentos manuais.



Figura 34 – Irrigação final com 3 ml de soro fisiológico.



Figura 35 – Secagem do canal com pontas de papel absorvente.

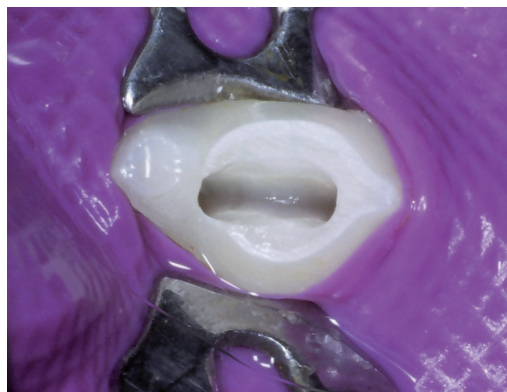


Figura 36 – Preparação biomecânica de ambos os canais finalizada.

Após determinar, de modo aleatório, a raiz a ser alvo de medicação intracanal com o gel de clorhexidina, foi colocada no seu interior uma ponta de papel esterilizada de diâmetro igual à lima apical mestre, de forma a impedir o acesso dos materiais utilizados na obturação canalar da raiz adjacente (Fig. 37).

No canal obturado na primeira sessão foi executado o seguinte protocolo operatório:

- 1 – aplicação do Epiphany™ primer transportado com uma ponta de papel absorvente de tamanho igual ao diâmetro apical da preparação (Fig. 38), deixado no interior do canal por um período de 20 segundos (Fig. 39), após o qual foram removidos os excessos com pontas de papel absorvente;
- 2 – selecção do cone principal de material de núcleo, Resilon™ (Epiphany points refill kit), de modo a obter “tug-back” a 0,5 mm do comprimento de trabalho (Fig. 40);
- 3 – escolha do compactador do *system B™* (SybronEndo), capaz de chegar a 4 mm do comprimento de trabalho;
- 4 – distribuição do cimento endodôntico Epiphany™ (Root Canal Sealant Epiphany™), com espiral de Lentulo a 500 rpm (Motor TCM Endo-Nouvag), introduzida até 2 mm do comprimento de trabalho (Fig. 41);
- 5 – introdução do cone principal;
- 6 – compactação vertical com *system B™* à temperatura de 160°C, potência nível 8, no modo “touch”;
- 7 – inserção de incrementos de material de núcleo, com compactação vertical, para preenchimento completo do canal até ao nível da junção amelocementária;

- 8 – remoção dos excessos e limpeza da câmara com algodão esterilizado;
- 9 – fotopolimerização durante 20 segundos, com aparelho Optilux 501 (Demetron/Kerr corporation) com a intensidade de  $500 \text{ mW/cm}^2$  (Fig. 42);
- 10 – limpeza de excessos de material da cavidade de acesso (Fig. 43);
- 11 – colocação de bola de algodão sobre o orifício de entrada do canal;
- 12 – restauração provisória com Photac™ Fil Quick Aplicap (3M-ESPE), fotopolimerizado durante 20 segundos. Esta restauração teve como objectivo isolar o canal obturado e criar uma separação entre a raiz mesial e distal, de modo a impedir a passagem do gel de clorohe-xidina para o canal já obturado (Fig. 44).



Figura 37 – Protecção do canal a medicar com clorohexidina com ponta de papel.

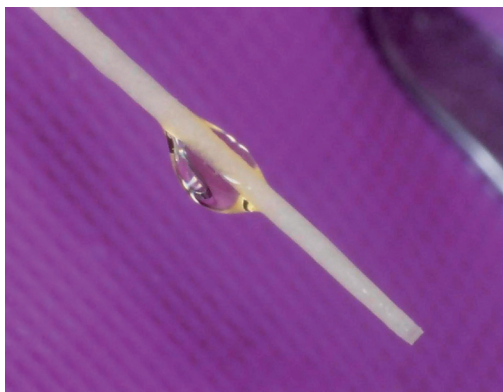


Figura 38 – Transporte do Epiphany™ primer com ponta de papel.

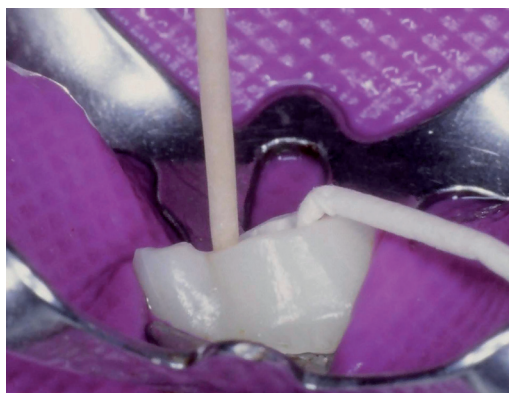


Figura 39 – Condicionamento do canal com Epiphany™ primer durante 20 segundos.

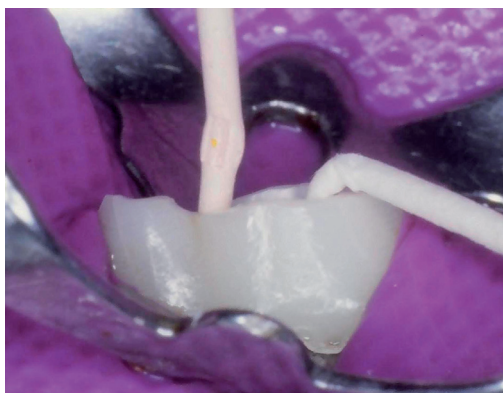


Figura 40 – Prova do cone principal de Resilon™.



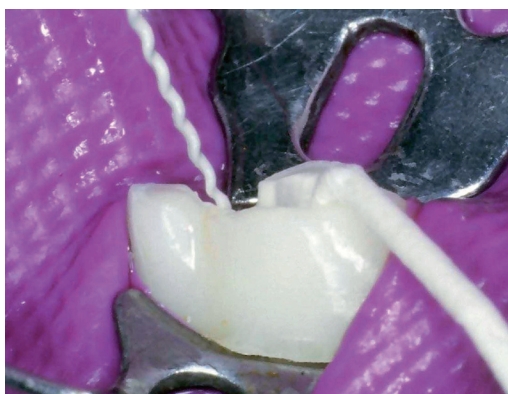


Figura 41 – Aplicação do cimento endodôntico Epiphany™ com espiral de Lentulo

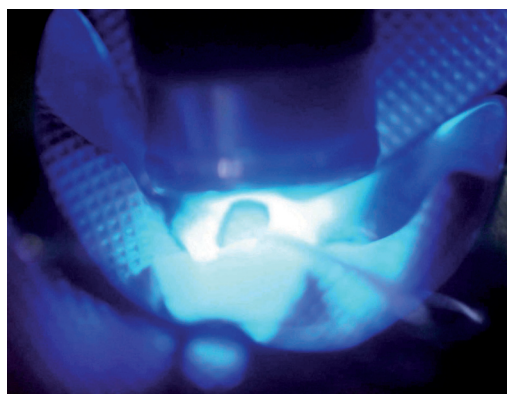


Figura 42 – Fotopolimerização, durante 20 segundos, após compactação do material de obturação

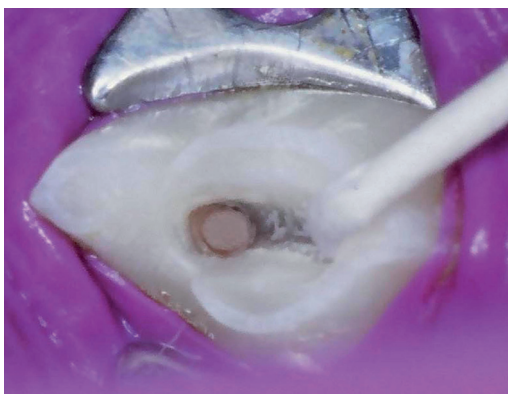


Figura 43 – Canal obturado com Epi-phany™/Resilon™ ao nível da junção cimento-dentinária.



Figura 44 – Restauração de metade da cavidade de acesso com Photac™ Fil Quick Aplicap.

Após finalizado este procedimento, foi retirada a ponta de papel absorvente e introduzido o gel de clorhexidina a 2%, com o auxílio de uma espiral de Lentulo a 500 rpm (Fig. 45). Removeram-se os excessos da câmara e colocou-se uma bola de algodão esterilizada ao nível do orifício de entrada do canal (Fig. 46). De seguida realizou-se a restauração da cavidade de acesso com Photac™ Fil Quick Aplicap (3M ESPE), cor B3, fotopolimerizado durante 20 segundos.



Figura 45 – Introdução do gel de cloro-hexidina no canal com espiral de Lentulo.

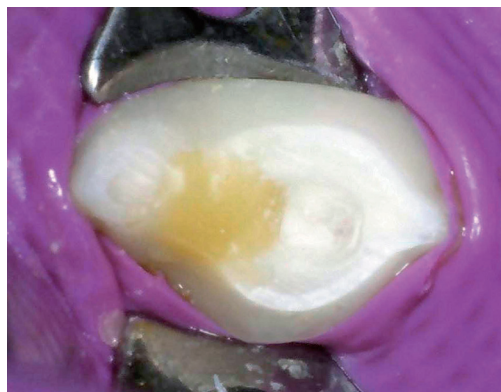


Figura 46 – Colocação de bola de algodão no orifício de entrada do canal.

## 2ª intervenção – 1 semana depois

Após a anestesia geral do animal, executou-se o isolamento absoluto do campo operatório, o polimento dentário com pasta profilática Zircon® (Produits Dentaires) e a desinfecção do campo operatório com solução de iodopovidona a 10% (Iodolab-Labesfal)(Fig. 47). Foi feita a remoção parcial da restauração coronária, de modo a ter acesso ao canal com medicação intracanal, mantendo intacta a parte correspondente ao canal já obturado, com o objectivo de manter uma compartimentação da câmara pulpar em duas áreas independentes. Removeu-se a bola de algodão do orifício de entrada do canal com tiranervos (Fig. 48), e fez-se a irrigação com 3 ml de soro fisiológico com agulha Monoject® (Sherwood Davis&Geck) de calibre 27G (Fig. 49). Seguiu-se a secagem do canal com pontas de papel absorvente de tamanho igual ao diâmetro da preparação apical e a obturação com o mesmo protocolo utilizado para os canais não medicados com cloro-hexidina (Fig. 50 e 51). De seguida realizou-se a restauração da cavidade de acesso com Photac™ Fil Quick Aplicap (3M ESPE), cor A1, fotopolimerizado durante 20 segundos (Fig. 52) e uma radiografia periapical de controlo pós-operatório.

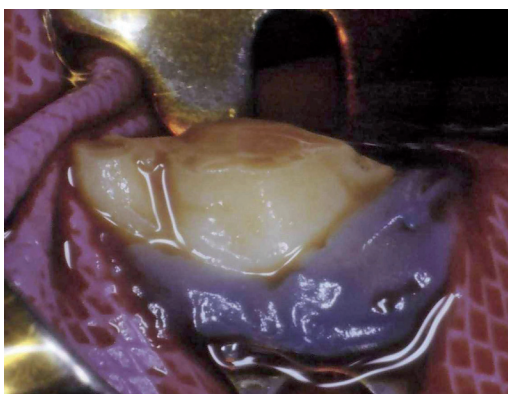


Figura 47 – Antissépsia do campo operatório com solução de iodopovidona antes de iniciar a 2ª intervenção.

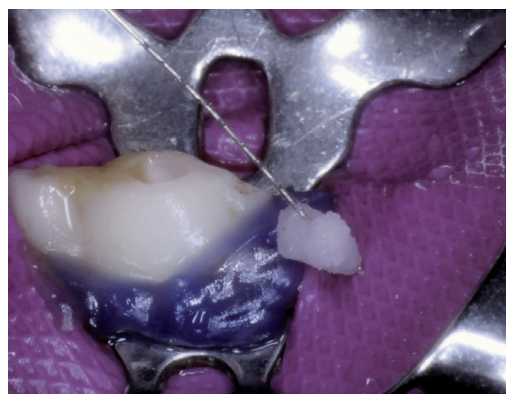


Figura 48 – Remoção de bola de algodão da entrada do canal com tiranervos.



Figura 49 – Irrigação com soro fisiológico com agulha Monoject® de calibre 27G.

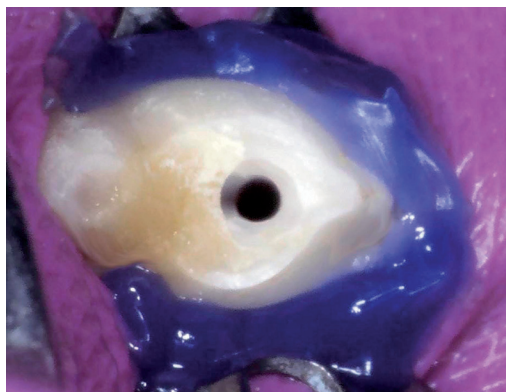


Figura 50 – Canal preparado para obtenção.

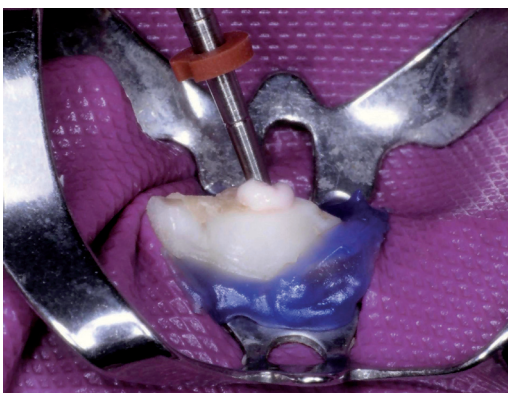


Figura 51 – Obturação canalar com sistema Epiphany™/Resilon™.



Figura 52 – Restauração coronária Photac™ Fil Quick Aplicap.



### **3ª intervenção – 3 semanas depois**

Após a sedação do animal procedeu-se à exposição dos dentes dos grupos teste e controlo positivo à saliva (Figs. 53 e 54). Nos grupos teste, o acesso à câmara foi efectuado com broca diamantada Endo Access™, expondo a obturação de ambos os canais, com o cuidado de preservar um septo de Photac™ Fil Quick Aplicap no centro da cavidade de acesso, mantendo a separação entre o compartimento correspondente a cada um dos canais.

No grupo controlo positivo foi aberta a cavidade de acesso e ambos os canais, não obturados, ficaram expostos ao meio oral.



Figura 53 – Exposição do dente controlo positivo e manutenção da restauração coronária do controlo negativo íntegra.



Figura 54 - Exposição da cavidade de acesso dos dentes dos grupos teste.

### **4ª intervenção – 4 semanas**

Após a sedação do animal realizou-se a inoculação de placa bacteriana autóloga no interior da cavidade de acesso dos dentes dos grupos de teste e controlo positivo, e o isolamento relativo dos dentes, com posterior colocação de bola de algodão sobre a placa bacteriana e respectiva restauração com Photac™ Fil Quick Aplicap (Figs. 55 e 56), bem como radiografia periapical final.

Não foi realizada qualquer intervenção sobre os dentes do grupo controlo negativo.



Figura 55 –Restauração coronária do controlo positivo.



Figura 56 - Restauração coronária dos dentes dos grupos teste.

## 2.7. Recuperação da anestesia e sedação

Após as intervenções, os animais foram colocados em estruturas individuais, numa sala com temperatura adequada, escura, silenciosa e limpa, tendo sido vigiados na sua recuperação. Tomaram-se também medidas para evitar traumatismos aquando do início da actividade motora. Todos os animais recuperaram completamente após os procedimentos de anestesia e sedação.

## 2.8. Avaliação clínica e radiográfica da cavidade oral

Após finalizar o protocolo operatório e durante todo o período de “follow-up” foram realizadas inspecções mensais da cavidade oral para pesquisar sinais de patologia infecciosa, sobretudo ao nível dos dentes controlo positivo, bem como avaliada clinicamente a integridade das restaurações coronárias. Ao longo das 30 semanas do estudo, apenas uma das restaurações coronárias sofreu fractura (cão 2, 2º prémolar inferior, aos 3 meses) mantendo-se íntegras as restantes 59 restaurações.

Às 12 semanas após a inoculação coronária, foram realizadas radiografias dos dentes de dois dos animais em estudo, no sentido de avaliar o aparecimento de patologia periapical.

O comportamento e peso dos animais foram controlados de modo a detectar alguma perturbação que pudesse indiciar sinais de patologia ou sofrimento, os quais não foram observados ao longo do período do estudo.

## **2.9. Eutanásia dos animais**

Decorridos seis meses após a inoculação bacteriana, procedeu-se à última intervenção cirúrgica, a eutanásia dos animais, seguindo o protocolo de anestesia geral. Durante esta intervenção foi realizado o exame clínico, dando especial atenção aos seguintes aspectos:

- 1 – integridade das restaurações coronárias;
- 2 – estado periodontal;
- 3 – mobilidade dentária; além disso, foram realizadas radiografias periapicais a todos os dentes envolvidos no estudo.

Durante esta última intervenção, destinada à eutanásia, foram realizados os procedimentos para fixação *in vivo* dos tecidos dos maxilares. Para isso, o animal foi colocado em posição de decúbito dorsal e realizado o acesso cirúrgico, com dissecação dos tecidos, até se conseguir uma exposição adequada das carótidas primitivas. Seguidamente foi passado um fio dando um nó à volta destes vasos, o que permitiu colapsar o vaso, interrompendo momentaneamente a circulação sanguínea.

Foram então cateterizados os vasos e injectados 120 ml de formol a 10% em cada carótida, em simultâneo, e de novo restabelecida a circulação sanguínea desapertando o nó dado previamente. Desta forma foi facilitada a circulação do formol em direcção cefálica, dificultando o seu refluxo em sentido inverso. A perfusão e fixação dos tecidos pôde ser confirmada pelo aparecimento progressivo de um aspecto esbranquiçado das mucosas.

Logo de imediato, para assegurar a eutanásia por métodos humanitários, injectou-se, por via endovenosa, uma "overdose" de anestésico (pentotal sódico). Todos os animais sofreram paragem cardíaca ao fim de alguns segundos, confirmada pelo monitor de ECG e por auscultação.

## **2.10. Colheita de amostras para histologia**

A colheita do maxilar superior e da mandíbula foi realizada em bloco. Para o efeito, foram efectuadas incisões e dissecados os tecidos moles de modo a expôr o osso cortical. No maxilar foi realizada uma osteotomia transversal por distal do 4º prémolar superior e na mandíbula foram efectuados cortes transversais por distal do 1º molar inferior. Estes blocos foram imersos em formol neutro tamponado a 4°C e transportados para o laboratório para posterior manipulação.

### 2.11. Preparação histológica

Todos os espécimes foram preparados para estudo histológico em material descalcificado no Laboratório do Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Do maxilar foram preparados 3 blocos contendo as raízes dos dentes: a) mesial do 2º pré-molar; b) distal do 2º pré-molar e mesial do 3º; c) distal do 3º pré-molar (Fig. 57). De cada quadrante da mandíbula foi removido um bloco contendo os 2º, 3º e 4º pré-molares, e este bloco foi posteriormente dividido em duas partes entre as raízes do 3º pré-molar (Fig. 58).



Figura 57 – Blocos de tecido preparados a partir do maxilar superior. A) raiz mesial do 2º pré-molar; B) raízes distal do 2º pré-molar e mesial do 3º; C) raiz distal do 3º pré-molar.

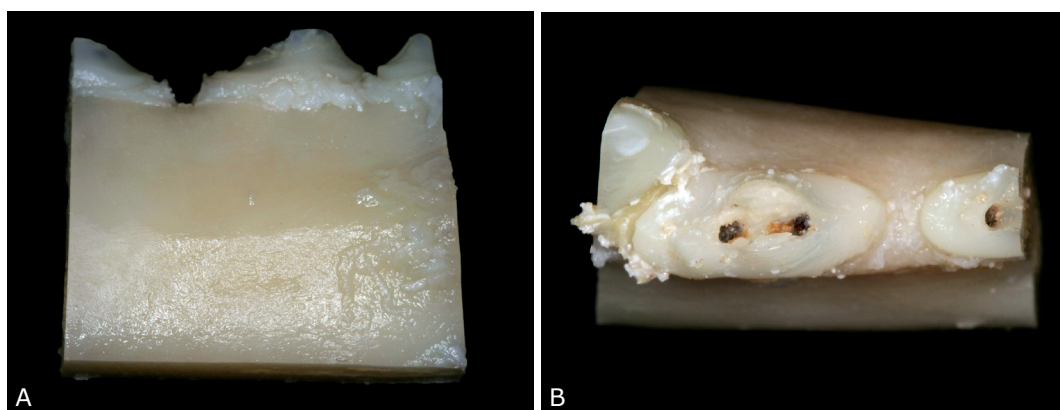
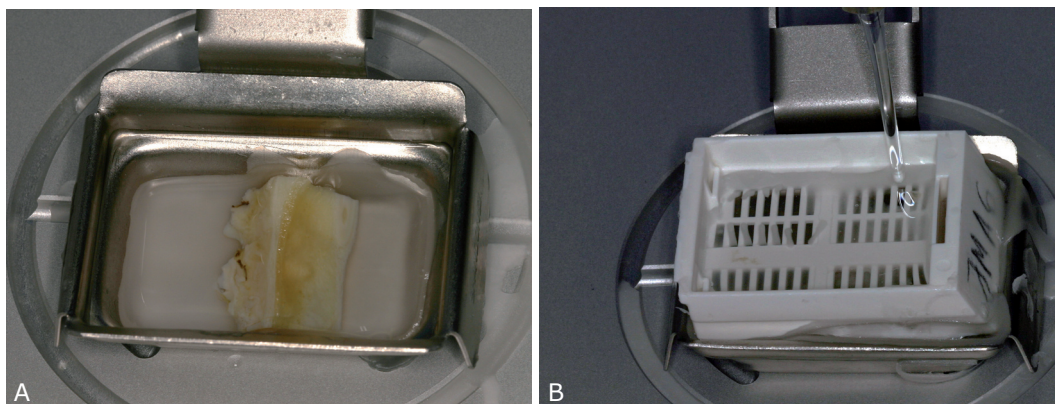


Figura 58 – Blocos de tecido obtidos a partir da mandíbula.

A) 2º pré-molar e raiz mesial do 3º; B) 4º pré-molar e raiz distal do 3º.



Figuras 59A e 59B – Inclusão das amostras em parafina.

Os blocos foram identificados e submetidos a fixação em formol neutro tamponado durante 48 horas. A descalcificação foi efectuada por imersão em solução de Morse (ácido fórmico a 50% + citrato de sódio a 20% em partes iguais), sob agitação permanente, durante um período mínimo de oito semanas. Realizou-se a desidratação com uma série crescente de alcóois, seguida de diáfanização em xilol e infiltração e inclusão em parafina (Fig. 59).

Foram realizados cortes seriados em micrótomo rotativo e 2 de cada 10 cortes foram montados em lâminas e corados pela técnica da hematoxilina e eosina, para avaliação por microscopia de luz. Destes foram seleccionados 5 cortes representativos de diferentes planos de cada uma das raízes e avaliados em relação aos parâmetros em estudo. Além disso, para cada uma das raízes foi corada uma lâmina pela técnica de Brown&Brenn e Van Giemsa.

Os parâmetros avaliados incluíram: a) inflamação periapical; b) reabsorção de cimento e dentina; c) encerramento dos *foramina* apicais; d) espessura do ligamento periodontal; e) área de cimento secundário; f) limite da obturação canalar; g) presença de células fagocitárias e h) presença de bactérias.

As categorias aplicáveis a cada parâmetro encontram-se na tabela 8.



Tabela 8 – Parâmetros histológicos avaliados e respectivos níveis

<b>Inflamação periapical</b>	(0) Ausente, com aspecto normal da superfície radicular e tecidos de suporte (1) Ligeira, com infiltrado inflamatório localizado e sem evidência de reabsorção óssea ou radicular (2) Grave, com infiltrado extenso e reabsorção radicular ou óssea
<b>Reabsorção dos tecidos duros</b>	(0) Sem reabsorção (1) Reabsorção de cimento (2) Reabsorção de cimento e dentina
<b>Encerramento dos foramina apicais</b>	(0) Completo (1) Mais de 50% da região apical (2) Até 50% da região apical
<b>Espessura do ligamento periodontal</b>	Média dos 5 resultados obtidos a partir da medição de 3 pontos pré-definidos na região apical da raiz
<b>Área de cimento secundário</b>	Média dos 5 resultados obtidos a partir da medição de uma área apical pré-definida nas lâminas seleccionadas
<b>Limite da obturação canal</b>	(0) Canal cementário (1) Ligeiro extravasamento de cimento (2) Sobreobturação com material de núcleo
<b>Células fagocitárias</b>	(0) Ausentes (1) Presentes
<b>Bactérias</b>	(0) Ausentes (1) Presentes

As amostras que evidenciaram extravasamento de cimento endodôntico nos tecidos periapicais foram ainda submetidas a uma análise específica do processo de reparação cicatricial e das características do infiltrado celular que os envolveram. Analisou-se a cápsula de tecido fibroso, tendo sido anotada a densidade e organização, bem como o tipo de infiltrado inflamatório. As respostas dos tecidos na área de implantação foram avaliados com base em diferentes parâmetros e utilizou-se um sistema numérico para a graduação da intensidade das reacções, conforme a tabela 9.

Tabela 9 – Tipo de resposta aos materiais de obturação canal extravasados para os tecidos periapicais

<b>Tipo de resposta</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Nível</b>
<b>Tecido normal</b>	Ausência de cápsula e de infiltrado inflamatório	0
<b>Reacção mínima</b>	Cápsula fibrosa, sem infiltrado inflamatório	1
<b>Reacção ligeira</b>	Cápsula fibrosa com linfócitos e ou plasmócitos	2
<b>Reacção moderada</b>	Cápsula fibrosa com macrófagos e/ou neutrófilos e/ou células gigantes de corpo estranho	3
<b>Reacção grave</b>	Presença de necrose com substituição do tecido por células inflamatórias	4

## 2.12. Histomorfometria

A histomorfometria foi feita tendo por base o programa de análise de imagem Sigma Scan Pro 5.0®. Este programa permite efectuar medições de comprimentos e áreas sobre imagens digitais com escala. As imagens histológicas foram obtidas a partir de um microscópio óptico de campo claro Nikon® Eclipse E600 (Nikon®, Japão) equipado com uma câmara fotográfica digital (Nikon Digital Camera DXM-1200 C) ligada a um computador com "software" de fotografia e análise de imagem Nikon ACT-1C.

Para o estudo histomorfométrico determinou-se que seriam avaliados os parâmetros relativos à espessura do ligamento periodontal e à área de cimento secundário, a partir de 5 imagens seriadas representativas de cada raiz, obtidas com ampliação constante e escala definida e inscrita pelo programa Nikon ACT-1C.

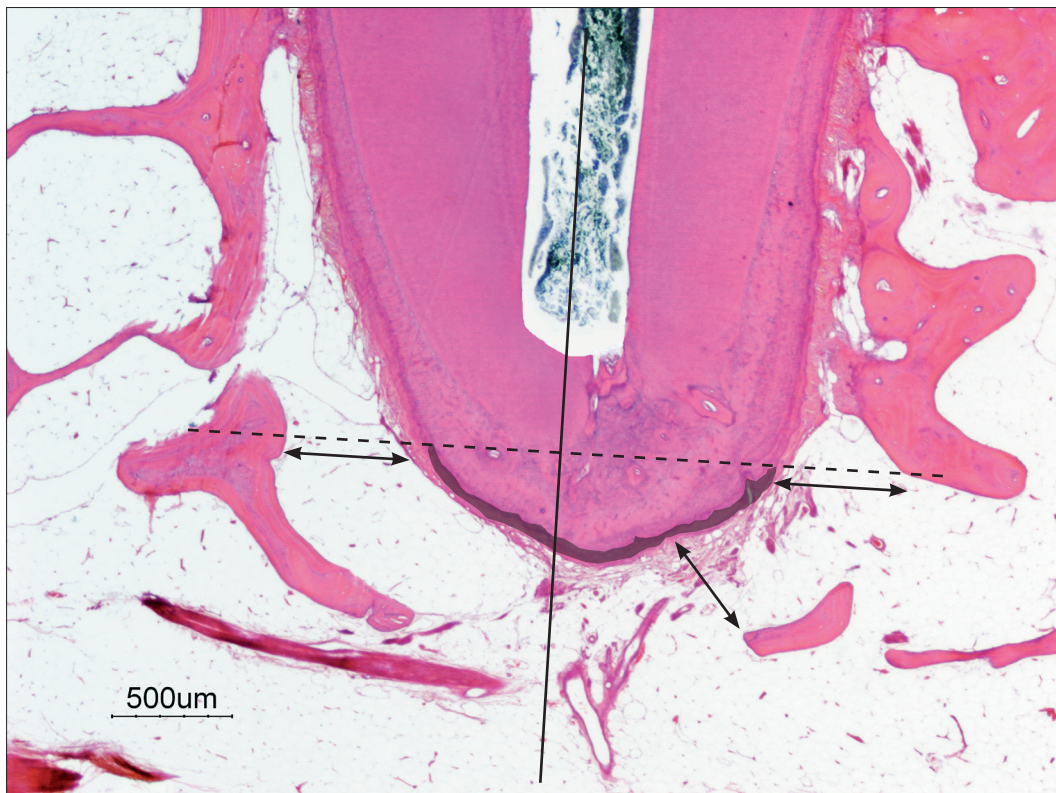


Figura 60 – Padronização de referências das medições realizadas para a análise de histomorfometria. Intersecção entre a perpendicular ao canal radicular e o ponto mais apical da junção cimento-dentinária. Pontos de medição para determinação da espessura do ligamento periodontal (setas). Área definida para medição da formação de cimento secundário com cor destacada.

A determinação da espessura do ligamento periodontal foi feita em cada amostra a partir da medição de 3 pontos pré-definidos: 1) entre o cimento e a trabécula óssea mais próxima da linha de prolongamento do canal radicular; 2) para mesial e distal de uma linha perpendicular ao longo eixo do canal radicular, na sua intersecção com a parte mais apical da junção cimento-dentinária (Fig. 60). Esta última linha também define o limite coronário da área de cimento secundário quantificada. O valor final atribuído a cada raiz correspondeu à média dos valores observados nas 5 lâminas seleccionadas para avaliação histomorfométrica.

### **2.13. Métodos estatísticos**

A análise estatística foi feita em ambiente Windows® XP, com recurso ao programa estatístico SPSS 14.0. O nível de inflamação periapical foi estudado pelo teste do qui-quadrado. Foi adoptado um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

A espessura do ligamento periodontal foi estudada por análise de variância (ANOVA) e a área de cimento secundário pelo teste T-Student. A relação entre os grupos em estudo e as variáveis anteriores foi avaliada pelo teste T-student e Mann-Whitney. A relação entre o nível de inflamação e a espessura do ligamento periodontal foi avaliado pelo teste Kruskal-Wallis. Foi adoptado para todos um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados

#### 3.1. Avaliação Clínica

Todos os animais toleraram os procedimentos operatórios sem problemas e recuperaram da anestesia de forma adequada. Ao longo do período experimental não foram observados sinais de dor ou sofrimento, nem manifestadas quaisquer alterações comportamentais. A evolução do peso foi monitorizada e as suas variações consideradas dentro dos parâmetros normais para a espécie e idade (Tab. 10 e Gráf. 6).

Clinicamente não foram observados sinais de edema ou fístula em nenhum dos dentes em estudo. Durante o período de observação apenas 1 dente do grupo teste sofreu fractura coronária aos 3 meses (cão 2, 2ºprémolar inferior esquerdo), ficando a câmara pulpar directamente exposta ao meio oral. Tendo em consideração que o grupo teste tinha já sido previamente exposto ao meio oral, não considerámos que a exposição por um diferente período constituísse motivo para a exclusão deste dente do estudo.

Tabela 10 – Evolução do peso dos animais ao longo período de estudo

Nº do cão	Nº do marcador	Idade na 1ª intervenção (meses)	Peso antes da 1ª intervenção (Kg)	Peso aos 3 meses (kg)	Peso aos 7 meses (kg)
1	985100010097801	27	13,0	14,0	13,3
2	985100009755129	27	11,8	10,8	11,2
3	985120012842664	26	11,5	11,3	10,9
4	985120013743266	23	12,0	12,4	11,5
5	985100010396378	20	12,1	11,7	11,0
6	985100010402981	20	12,0	11,4	13,5

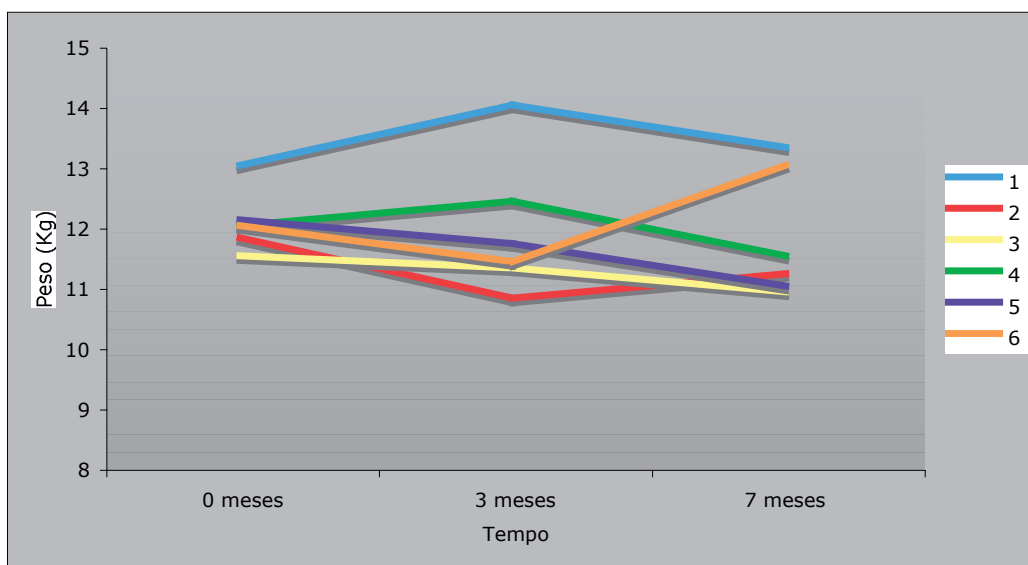


Gráfico 6 – Evolução do peso dos animais durante o período experimental

### 3.2. Avaliação radiológica

Nos controlos radiográficos efectuados para avaliação do resultado pós-operatório imediato podemos confirmar a obtenção de obturações canulares com densidade e homogeneidade compatíveis com um elevado padrão de qualidade técnica, como se pretendia no início do estudo. Foi possível identificar 3 raízes com extravasamento de cimento para os tecidos perirradiculares (2 no grupo teste e 1 no controlo negativo). Avaliaram-se também as restaurações coronárias dada a necessidade de controlo estrito da possibilidade de infiltração no grupo controlo negativo, constatando-se a integridade e correcta adaptação marginal das mesmas.

Na avaliação realizada aos 3 e aos 6 meses após inoculação, não foi verificado espessamento da lamina dura ou alteração da densidade óssea apical em nenhum dos dentes do grupo controlo negativo ou teste, apenas os controlos positivos evidenciaram ténues sinais radiográficos de presença de patologia periapical (Figs. 61 e 62).

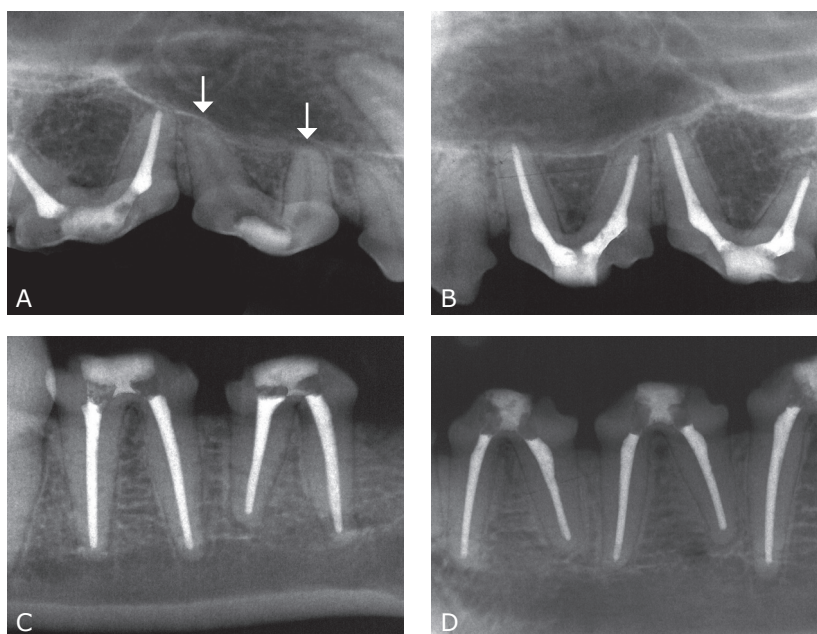


Figura 61 – Controle radiográfico aos 3 meses.

A) 1º quadrante, com controle positivo (setas); B) 2º quadrante, controles negativos;  
C) e D) mandíbula, dentes do grupo teste.

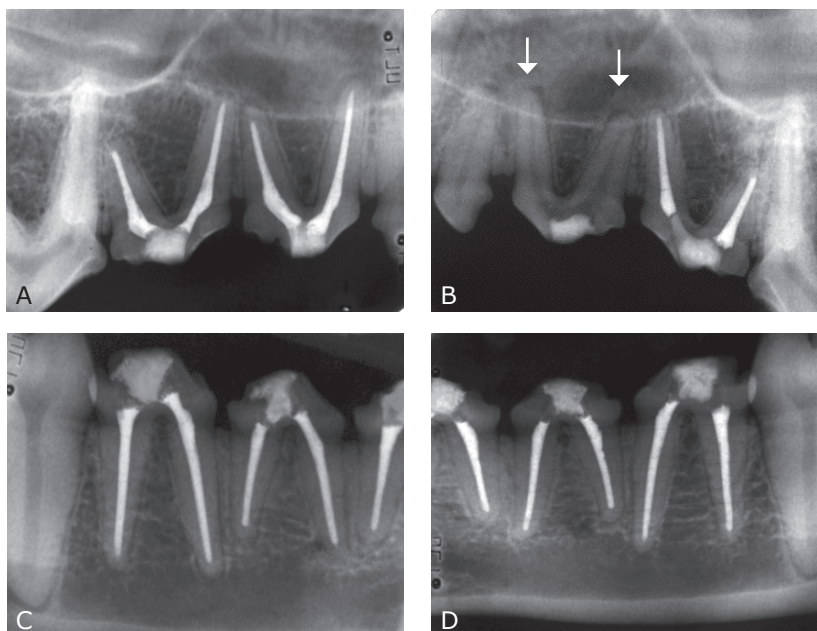


Figura 62 – Controle radiográfico aos 6 meses após a inoculação. A) 1º quadrante, com controles negativos; B) 2º quadrante, controle positivo com espessamento apical da lâmina dura (setas); C) e D) mandíbula, dentes do grupo teste.



### 3.3. Observação histopatológica

O processamento histológico permitiu a obtenção de imagens corono-apicais, efectuadas no plano mesio-distal, com elevado grau de paralelismo em relação ao longo eixo da raiz, possibilitando a avaliação de todos os parâmetros histológicos e histomorfométricos definidos na metodologia.

Das 120 raízes em estudo, apenas uma, pertencente ao grupo controlo negativo, foi inadvertidamente danificada durante o processamento histológico e excluída da análise. Das 108 raízes onde foi realizada obturação canalar, 13 (12%) apresentaram sinais histológicos de extravasamento de cimento endodôntico para os tecidos periapicais (Tab. 11 e Gráf. 7).

Apesar da execução da técnica de Brown e Brenn em todas as amostras, com a utilização de controlos positivos, não foi possível observar a presença de bactérias nas lâminas referentes à região do interior do canal radicular ou dos túbulos dentinários de nenhum dos grupos.

Tabela 11 – Identificação do número final de amostras disponíveis para análise histopatológica

Grupo	Nº total de raízes	Obturação no limite CDC	Extravasamento de cimento	Tratamento
Controlo positivo	12	n.a.	n.a.	Sem obturação canalar
Controlo negativo	17*	15	2	Grupo 1 – Resilon™/Epiphany™
	18	14	4	Grupo 2 – Clorohexidina + Resilon™/Epiphany™
Experimental	36	33	3	Grupo 1 – Resilon™/Epiphany™
	36	32	4	Grupo 2 – Clorohexidina + Resilon™/Epiphany™

\* amostra danificada durante o processamento; n. a.- não aplicável

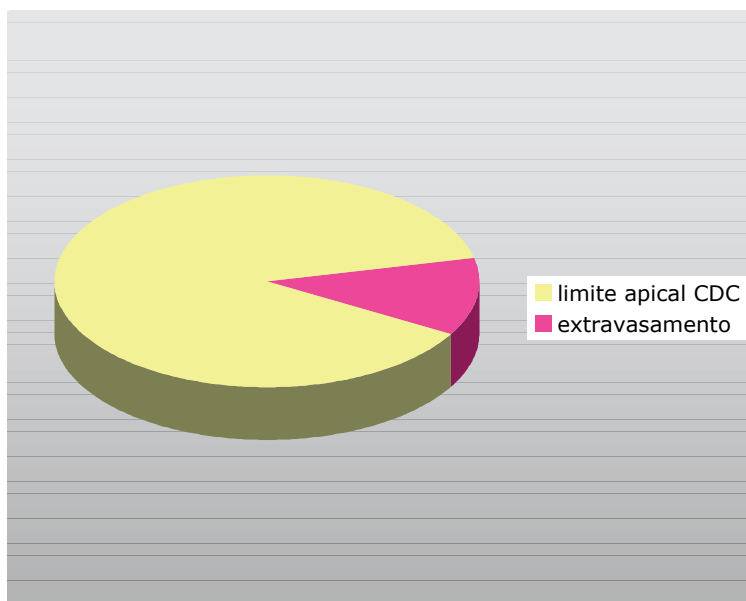
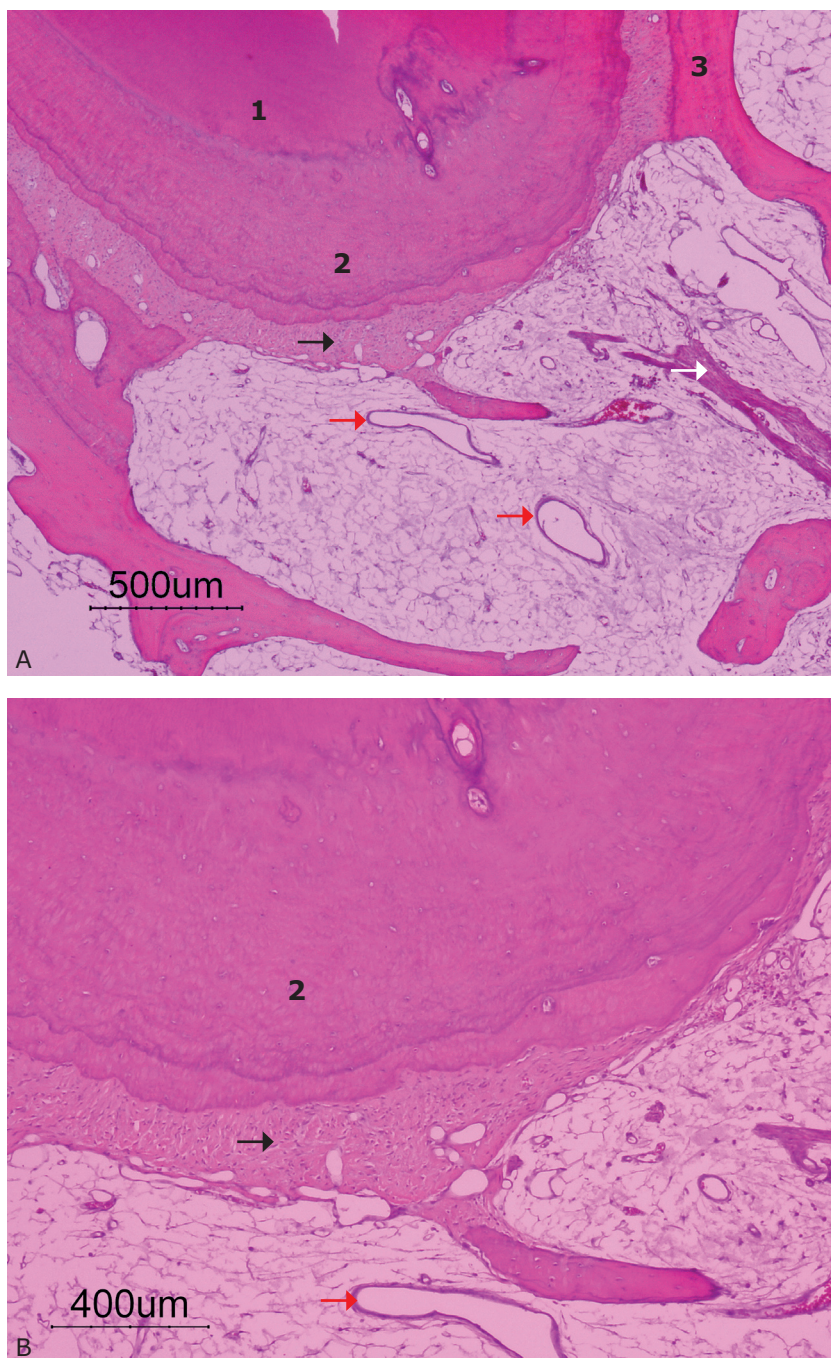


Gráfico 7 – Limite apical da obturação nas amostras estudadas

Visando proporcionar um melhor entendimento dos eventos biológicos e das variáveis em estudo, pareceu-nos adequado iniciar a apresentação dos resultados pelo grupo controlo positivo, que nos permite validar o modelo utilizado, ao confirmar o desenvolvimento de inflamação periapical em dentes não obturados e com o sistema de canais radiculares exposto ao meio oral. De seguida serão apresentados os resultados do grupo controlo negativo, que permitem avaliar a extensão da reacção dos tecidos periapicais à técnica operatória e a biocompatibilidade dos materiais utilizados, primeiro no grupo com obturação canalar numa única sessão, e depois, no grupo medicado com cloro-hexidina a 2%, durante 1 semana, e obturado na segunda intervenção. Serão posteriormente apresentados os resultados do grupo teste, onde foi avaliada a eficácia funcional dos materiais de obturação canalar, no que concerne à sua capacidade de prevenir a microinfiltração coronária e a progressão de microrganismos ao longo do canal radicular. Finalmente serão apresentados os casos em que se verificou extravasamento de cimento endodôntico Epiphany™, para os tecidos periapicais, dada a especificidade e as particularidades da reacção periapical observadas neste contexto. De modo a possibilitar a existência de uma referência histológica que permita uma melhor interpretação dos resultados do estudo, incluiremos também algumas imagens de histologia normal dos tecidos periapicais de um dente com polpa vital (Figs. 63A e 63B).



## HISTOLOGIA DA POLPA VITAL



Figuras 63A e 63B – Imagens de microscopia de luz da região periapical de um pré-molar de cão com polpa vital. Dentina radicular (1), cemento apical (2), ligamento periodontal (seta preta), osso alveolar (3), nervo dentário (seta branca), e vasos sanguíneos (setas vermelhas). H&E.



### 3.3.1. Grupo controlo positivo

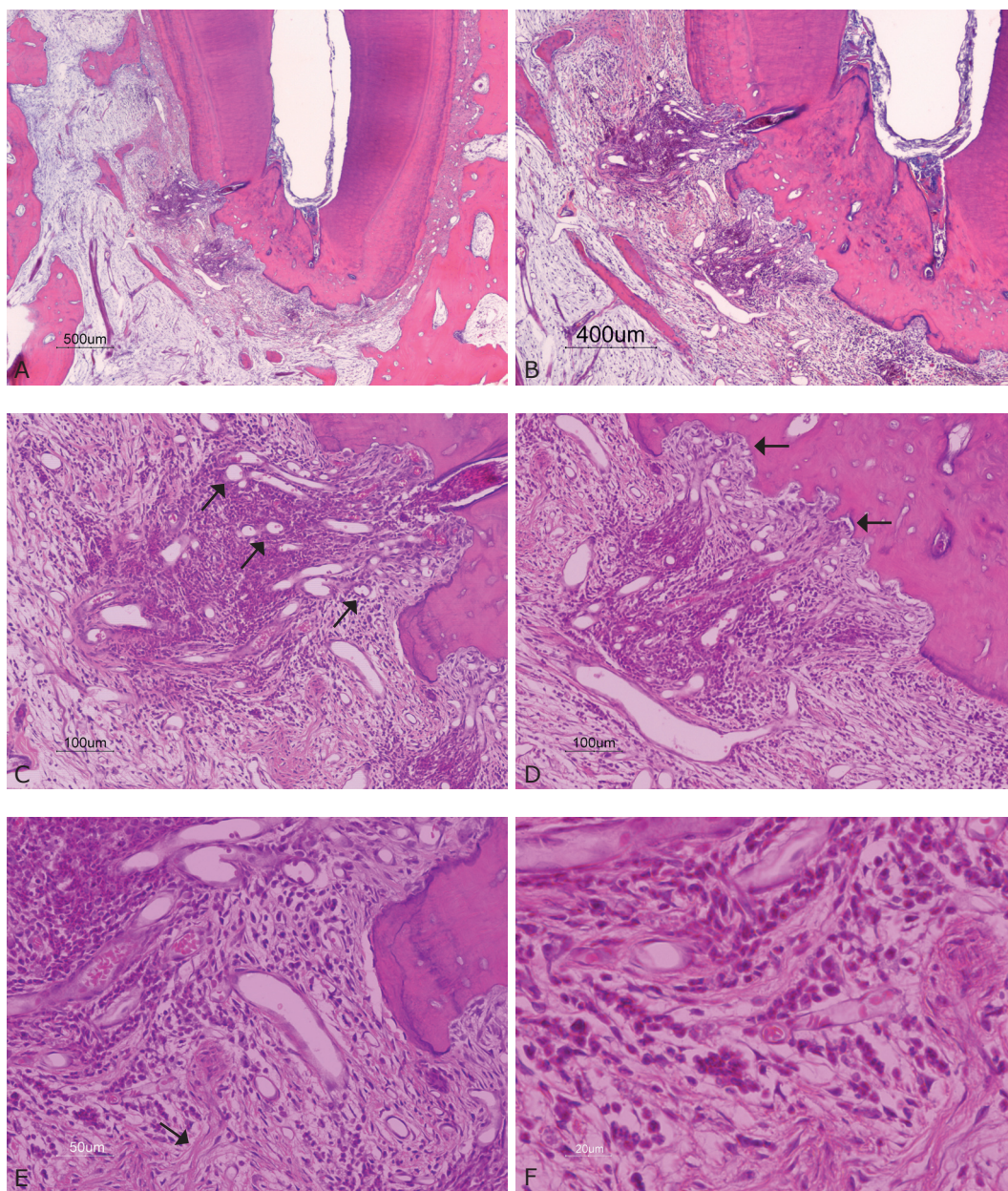


Figura 64 – Imagens de microscopia de luz com ampliações sucessivas de uma amostra do grupo controlo positivo. A) Inflamação periapical grave; B) Espessamento do ligamento periodontal; C) Abundância de neovasos (setas); D) Reabsorção radicular do cimento e dentina (setas); E) Presença de fibroblastos e colagénio (seta); F) Infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleadas. H&E.



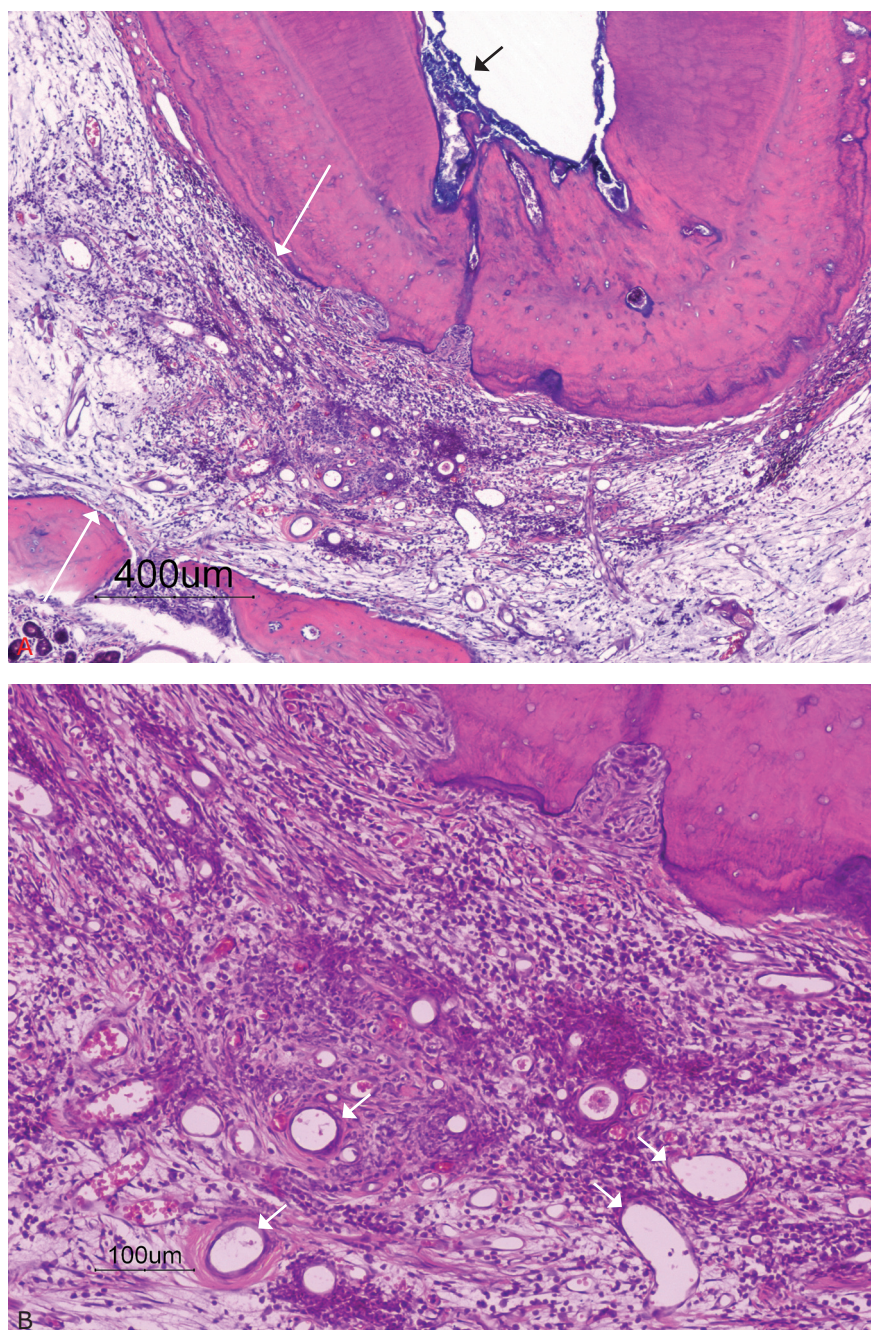


Figura 65 – Infiltrado inflamatório de intensidade grave, ampliações da mesma amostra. A) Espessamento do ligamento periodontal (setas brancas) e presença de resíduos no lúmen do canal radicular (seta preta), B) Infiltrado inflamatório composto predominantemente por células mononucleadas, com formação de neovasos (setas brancas), numerosos fibroblastos, reabsorção do cimento e da dentina radicular. H&E.

Todas as raízes do grupo controlo positivo, cujo sistema canalar foi preparado mas não obturado, sendo posteriormente removida a restauração coronária e expostas ao meio oral, durante uma semana, mostraram inflamação periapical com nível de intensidade grave.

Na série estudada o processo inflamatório encontrado apresentou um predomínio de células mononucleadas, com alguns polimorfunucleares presentes, grande riqueza de neovasos, e áreas extensas de reabsorção dos tecidos duros radiculares. Observou-se também a proliferação de fibroblastos com produção de colagénio. Estes aspectos morfológicos observados são compatíveis com o desenvolvimento de lesões crónicas do tipo granuloma periapical.

Constatámos a presença de grandes áreas de reabsorção radicular a nível apical, envolvendo o cimento e a dentina, mais pronunciadas junto à emergência dos *foramina*, caracterizadas pela presença de células gigantes multinucleadas. A reabsorção dos tecidos duros foi em todas as amostras de nível 2, ou seja, envolvendo o cimento e a dentina. Ao nível do osso alveolar, observou-se a presença de trabéculas com áreas irregulares que traduzem fenómenos de reabsorção, por osteoclastos, coexistentes com uma evidente estimulação da linha osteoblástica. Esta combinação revela um elevado "turnover" e pode ser indicativa de reparação tecidual activa.

De salientar ainda a presença de resíduos no interior do canal radicular e de células fagocitárias na região periapical, nomeadamente macrófagos e monócitos.

A espessura média do ligamento periodontal na região apical observada para este grupo foi de  $600 \pm 118 \mu\text{m}$ .



## 3.3.2. Grupo controlo negativo

## GRUPO 1 – SESSÃO ÚNICA

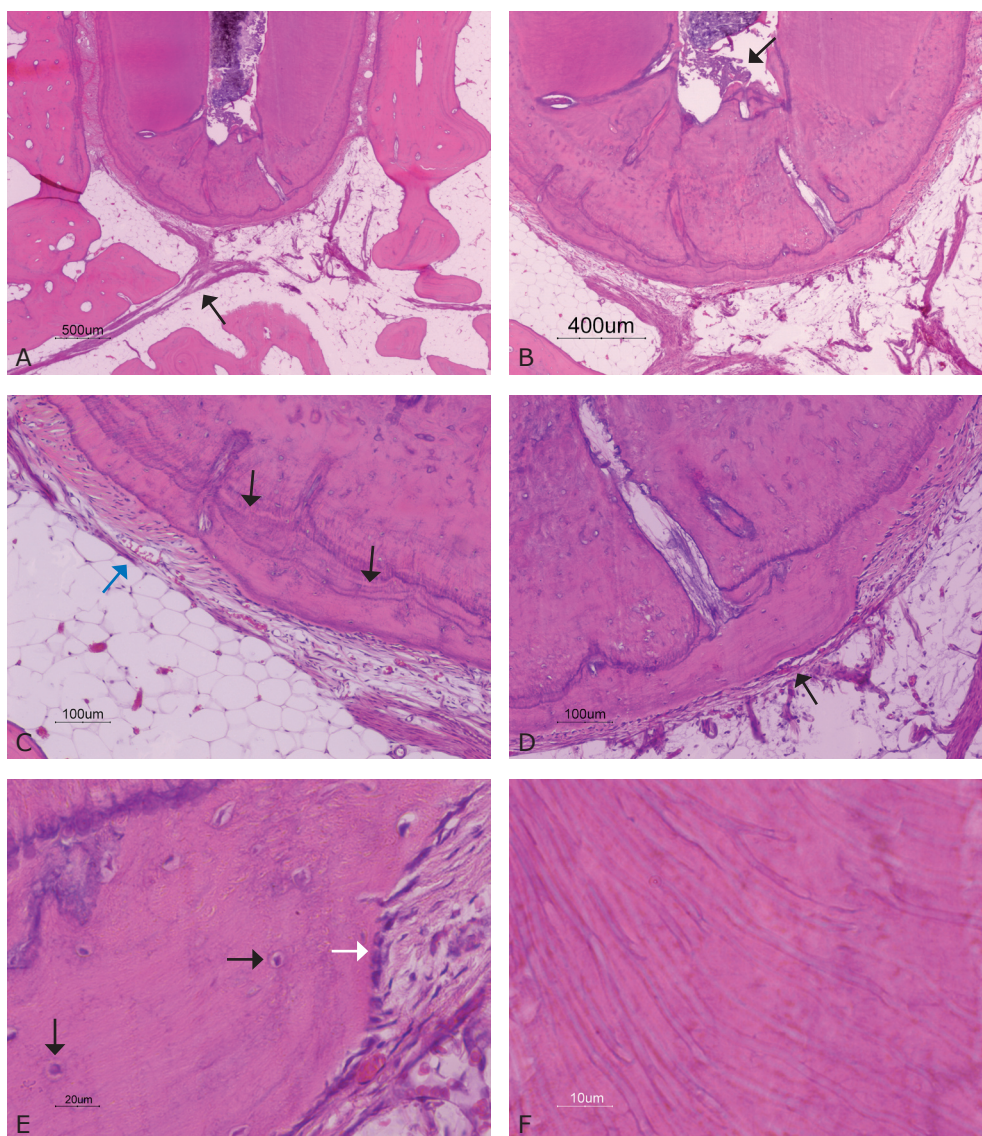


Figura 66 – Imagens de microscopia de luz de amostra sem aspectos morfológicos de presença de infiltrado inflamatório. A) Arquitectura fisiológica dos tecidos periapicais, onde destacamos o trajecto do nervo dentário (seta); B) Encerramento completo dos *foramina* apicais e presença de raspas de dentina na porção apical do canal (seta); C) Múltiplas linhas de deposição de cimento (setas pretas) e o ligamento periodontal adjacente normal (seta azul); D) Camada de cimento secundário encerrando *foramen* apical; E) Cimento secundário com cementócitos no interior (seta preta) e cementoblastos na superfície (seta branca); F) Trajectória dos túbulos dentinários, junto a parede apical do canal radicular. (H&E).

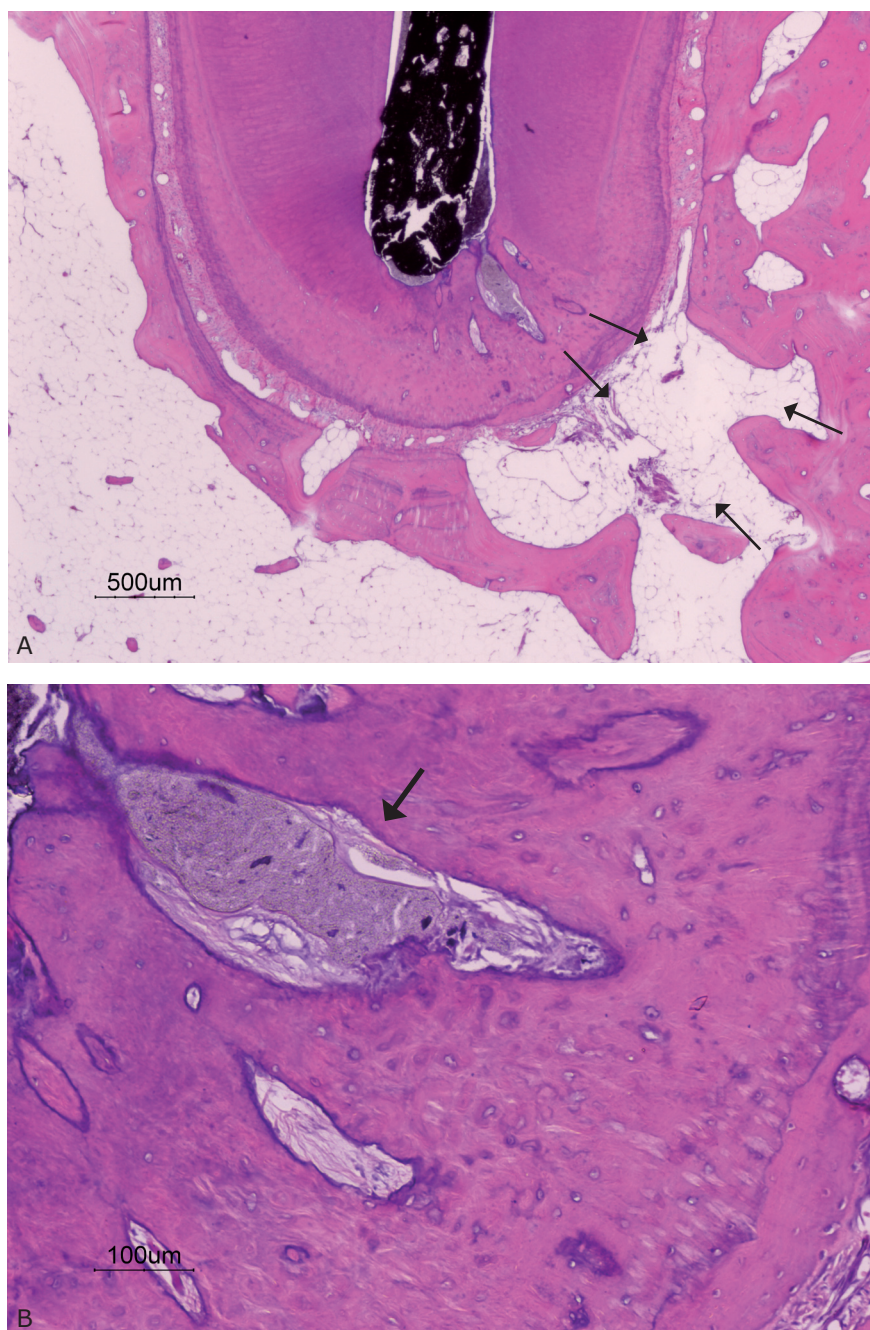


Figura 67 – Imagens de espécime do grupo controlo negativo 1 sem sinais morfológicos de inflamação. A) Pode observar-se a arquitectura fisiológica do ligamento periodontal, com um característico distanciamento do osso alveolar junto ao ápice (setas pretas); B) Preenchimento do canal cementário com cimento endodôntico Epiphany™, em contacto directo com fibras de colagénio do ligamento periodontal (seta preta). H&E.



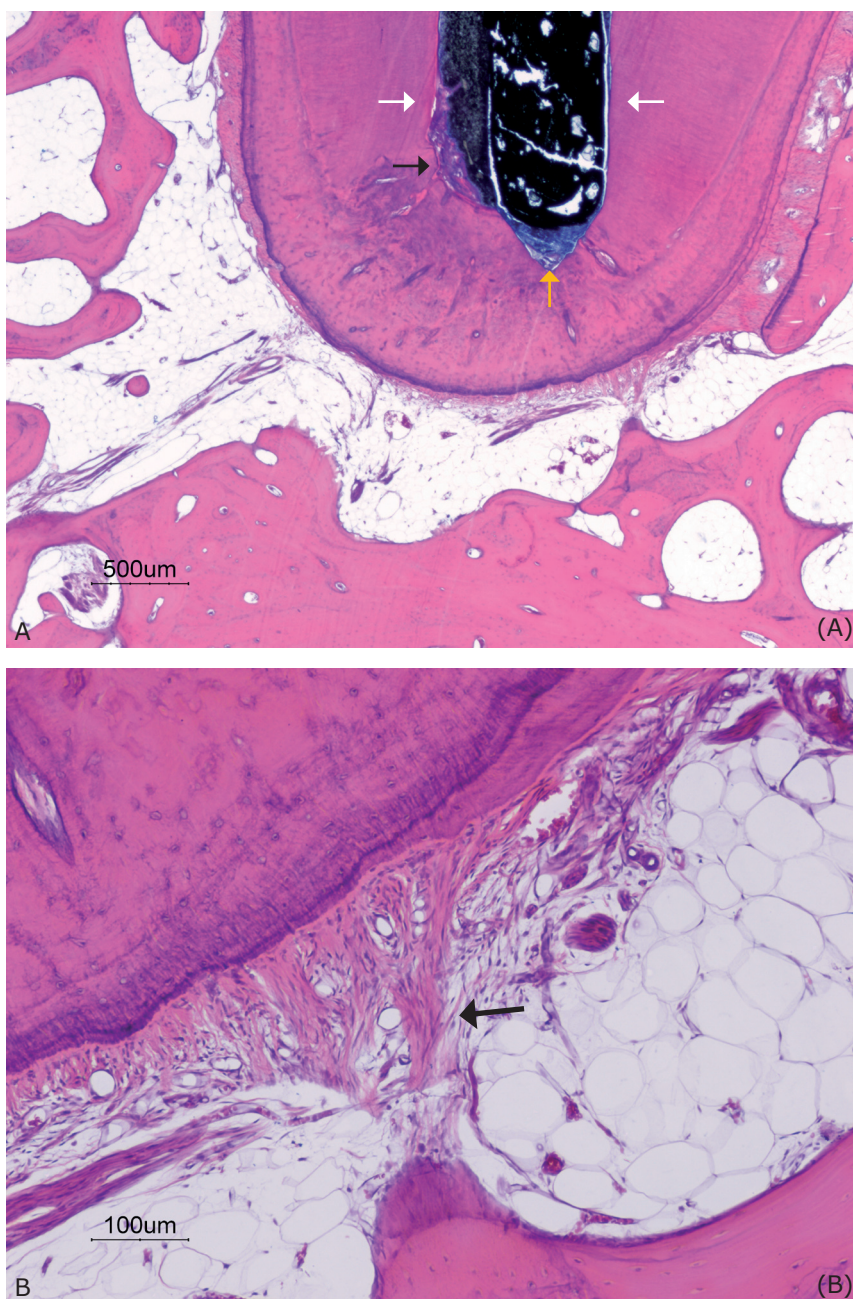


Figura 68 – Imagens de espécime do grupo controle negativo 1 sem inflamação periapical. A) Aspecto geral da região apical onde é visível uma camada assimétrica de cimento Epiphany™ em torno do material de núcleo Resilon™ (setas brancas). É também possível observar a permanência de restos de tecido pulpar no *terminus* apical do canal (seta preta) e sinais de possível acumulação de Epiphany™ primer (seta amarela). B) Fibras de Sharpey a ligar o cimento ao osso alveolar propriamente dito (seta). H&E.

Grupo 2 – MEDICAÇÃO COM CHX A 2%

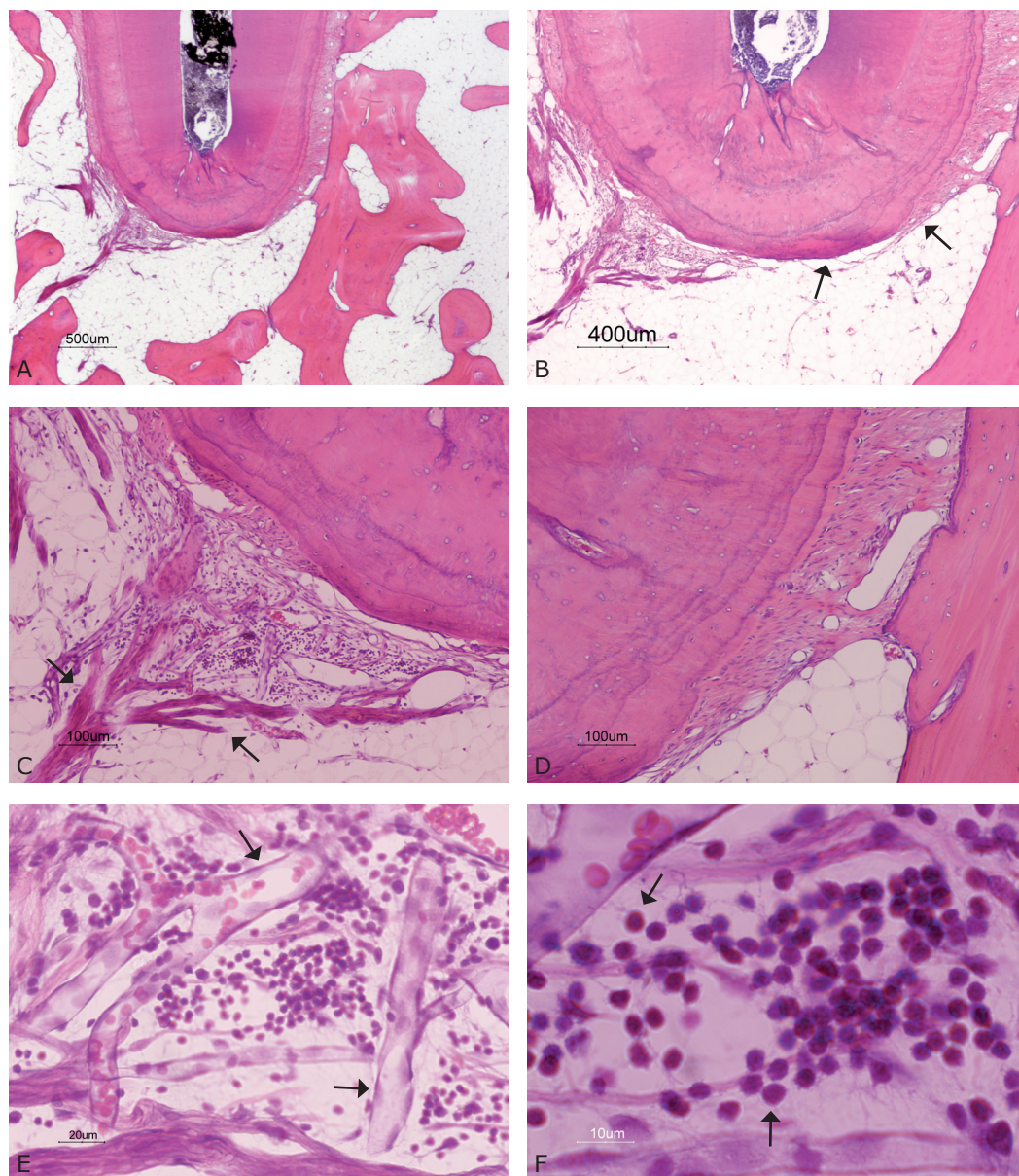


Figura 69 – Imagens de microscopia de luz com ampliações sucessivas da mesma amostra, apresentando inflamação periapical de intensidade ligeira. A) Arquitetura fisiológica do osso alveolar; B) Encerramento apical completo com cimento secundário; C) Infiltrado inflamatório localizado na face mesial do ápice radicular, junto a ramificações do nervo dentário (setas); D) Face distal do ápice radicular sem sinais de inflamação; E) Infiltrado inflamatório na proximidade de pequenos vasos (setas); F) Infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleadas (setas), morfologicamente compatíveis com linfócitos. H&E.



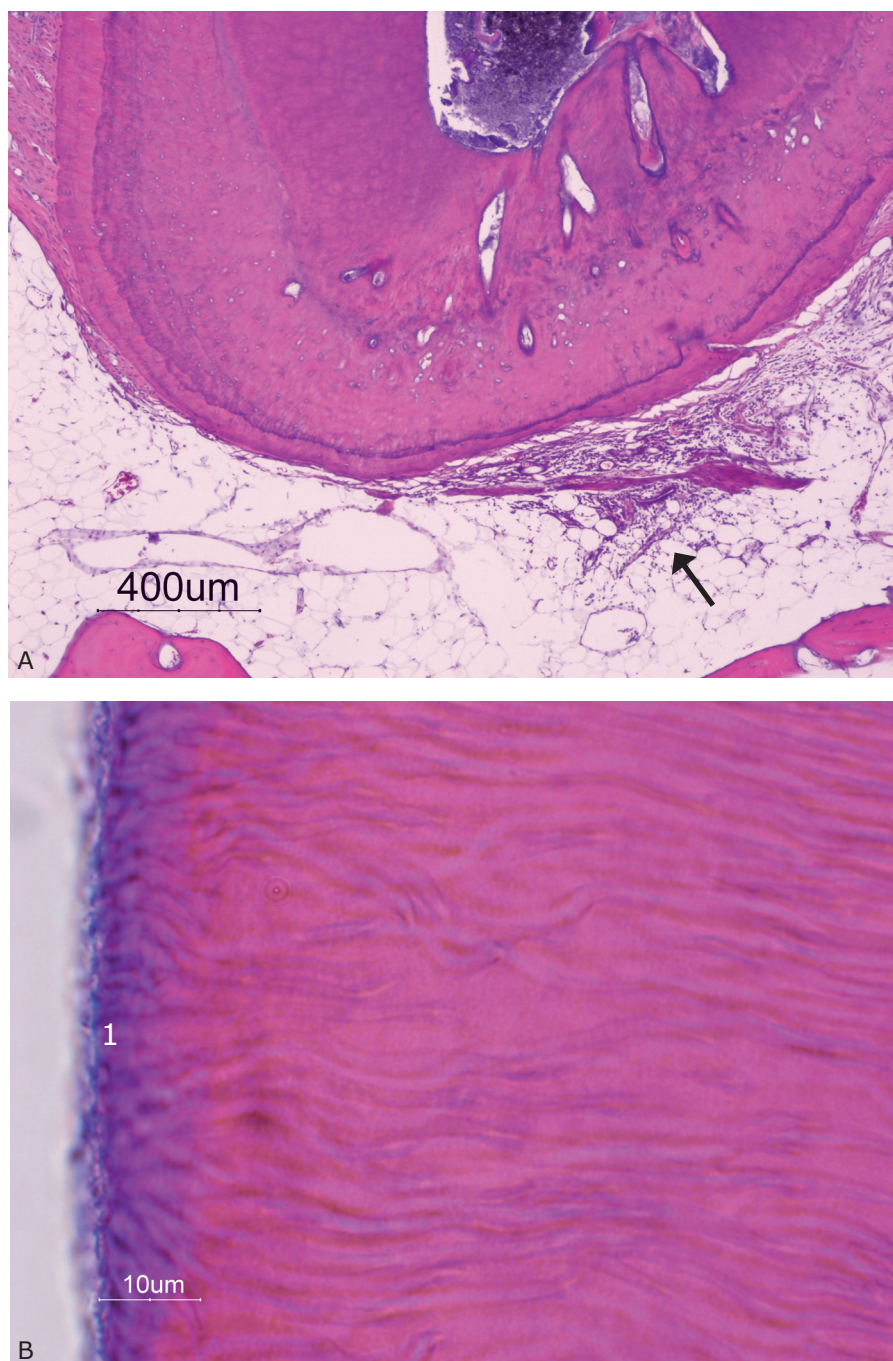


Figura 70 – Imagens de espécime do grupo controlo negativo 2 com inflamação periapical ligeira. A) Encerramento apical completo com cimento secundário e presença de infiltrado inflamatório localizado (seta preta), na proximidade do delta apical; B) Dentina junto à parede canal com sinais sugestivos de “hibridização” pelo Epiphany™ primer e cimento (1). H&E.

Das 29 amostras estudadas com a obturação canalar dentro do limite apical pretendido, 20 (68%) não evidenciaram sinais morfológicos de inflamação periapical e as restantes apenas registaram inflamação de intensidade ligeira, caracterizada por um infiltrado presente em áreas muito localizadas, sempre junto aos *foramina*, com predomínio de células mononucleadas características da inflamação crónica, como os linfócitos, os plasmócitos e os monócitos. Verificou-se uma tendência geral para o encerramento biológico completo do ápice por cimento secundário (90%; 26/29) e a manutenção da arquitectura normal dos tecidos periapicais. Constatou-se a presença de raspas de dentina no limite apical da preparação canalar em 14% das amostras. Nenhum dos espécimes deste grupo evidenciou inflamação de intensidade grave ou sinais de reabsorção do cimento ou dentina.

No grupo 1, com tratamento completo numa única sessão, 20% das amostras apresentaram inflamação periapical ligeira, enquanto que no grupo 2, com medicação intracanalar prévia com clorhexidina, verificou-se a presença de inflamação em 43% dos casos. Contudo, a diferença entre estes dois grupos não foi estatisticamente significativa ( $p=0,184$ ). A presença de células fagocitárias foi observada em 21% (3/14) das amostras do grupo 2 e em 13% (2/15) do grupo 1.

A espessura média do ligamento periodontal medida no grupo 1 foi de  $301 \pm 68 \mu\text{m}$  e para o grupo 2 de  $310 \pm 97 \mu\text{m}$ . Esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,133$ ) (Gráfico 8).

O grupo medicado com clorhexidina a 2% apresentou uma área de formação de cimento secundário ( $7895 \pm 2290 \text{ pixel}$ ) superior ao grupo 1 ( $5979 \pm 3008 \text{ pixel}$ ) sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p=0,041$ ).

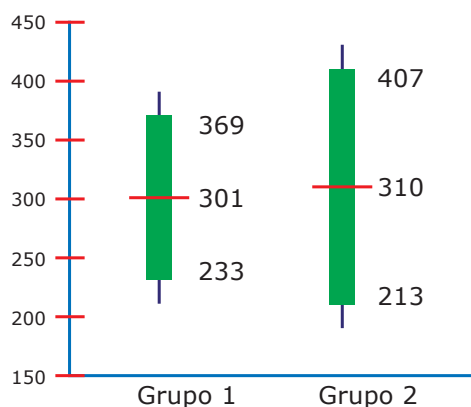


Gráfico 8 – Espessura média do ligamento periodontal nos grupos controlo negativo

### 3.3.3. Grupo teste

#### GRUPO 1 – SESSÃO ÚNICA

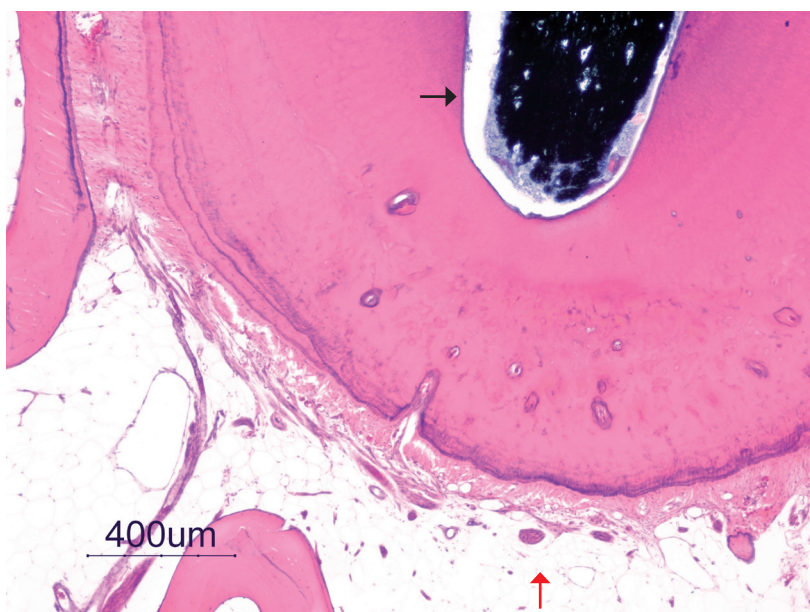


Figura 71 – Imagem de espécime do grupo teste 1 onde se destaca a preparação canalar sem resíduos pulpaes (seta preta) e a ausência de inflamação periapical (seta vermelha). H&E.

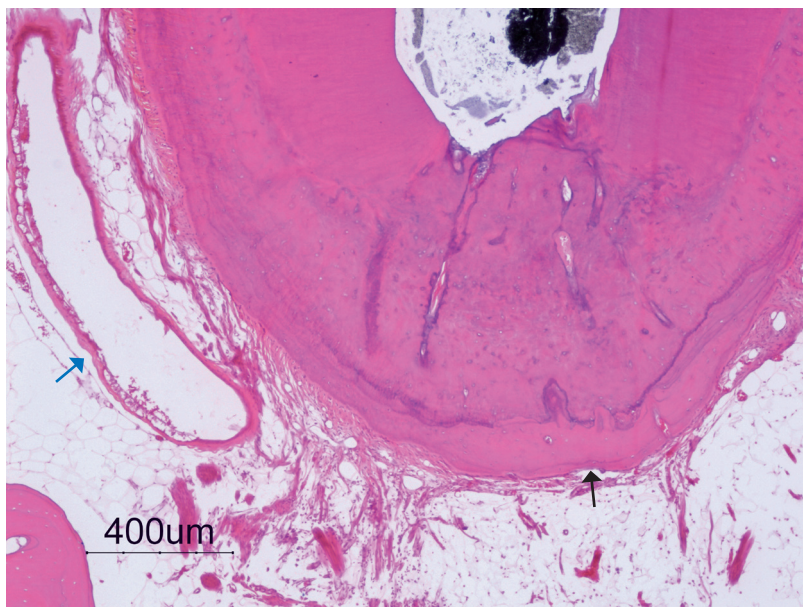


Figura 72 – Imagem de espécime do grupo de teste 1 com inflamação periapical ligeira, com acentuada deposição de cimento secundário (seta preta) e um vaso sanguíneo de grande dimensão (seta azul). H&E.



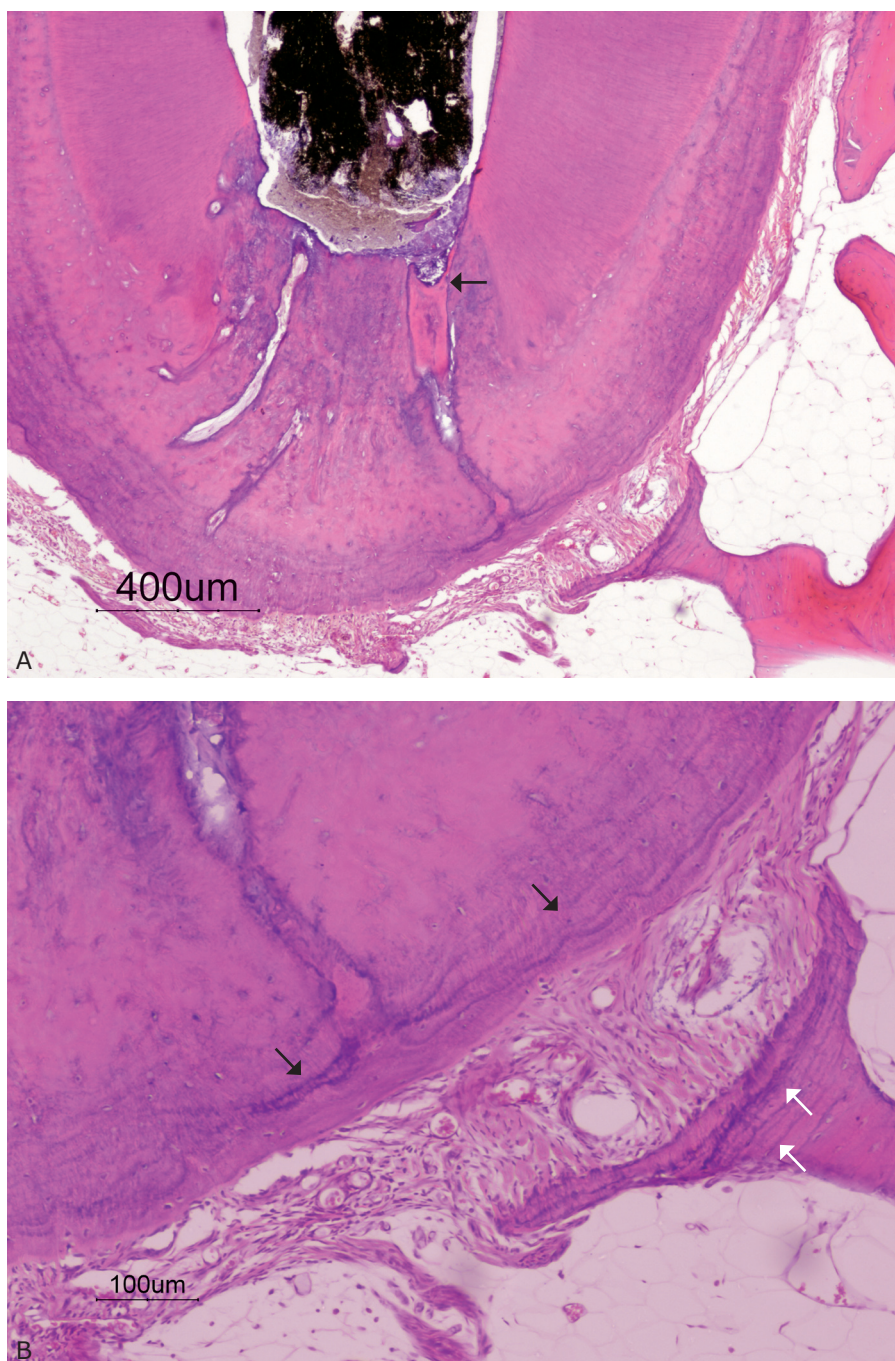


Figura 73 – Imagens de espécime de grupo de teste 1 sem sinais de inflamação periapical. A) Encerramento do lúmen do *foramen* com tecido duro até ao limite apical do material de obturação (seta preta); B) Múltiplas linhas de deposição de cimento secundário (setas pretas) e sinais de grande actividade osteoblástica no osso alveolar propriamente dito (setas brancas). H&E.

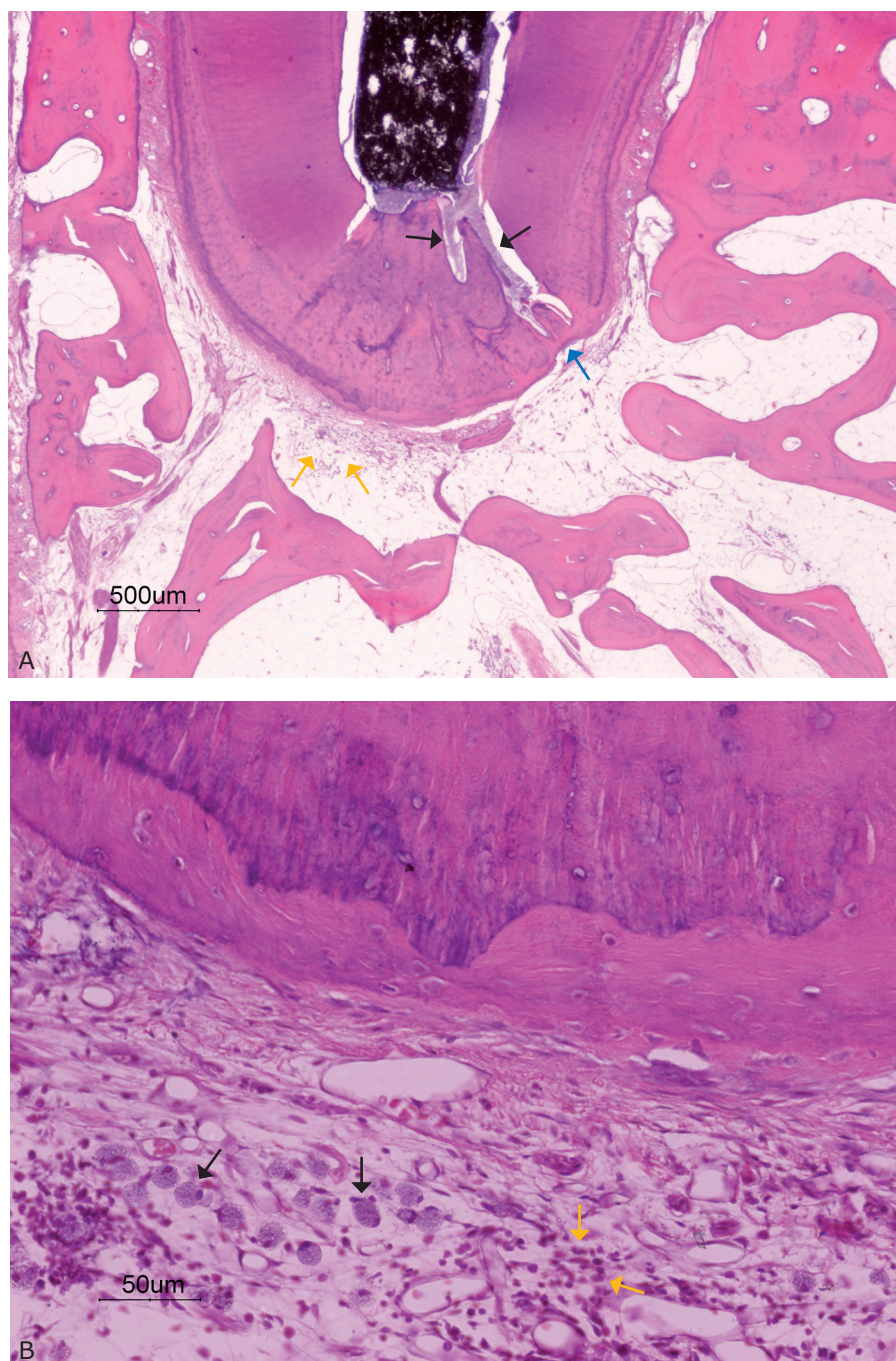


Figura 74 – Imagens de espécime do grupo de teste 1 com inflamação periapical de ligeira. A) Preenchimento dos *foramina* com cimento Epiphany™ (setas pretas), encerramento apical com cimento secundário (seta azul), e infiltrado inflamatório localizado (setas amarelas); B) Presença de infiltrado inflamatório localizado (setas amarelas), macrófagos (setas pretas) e cimento secundário.



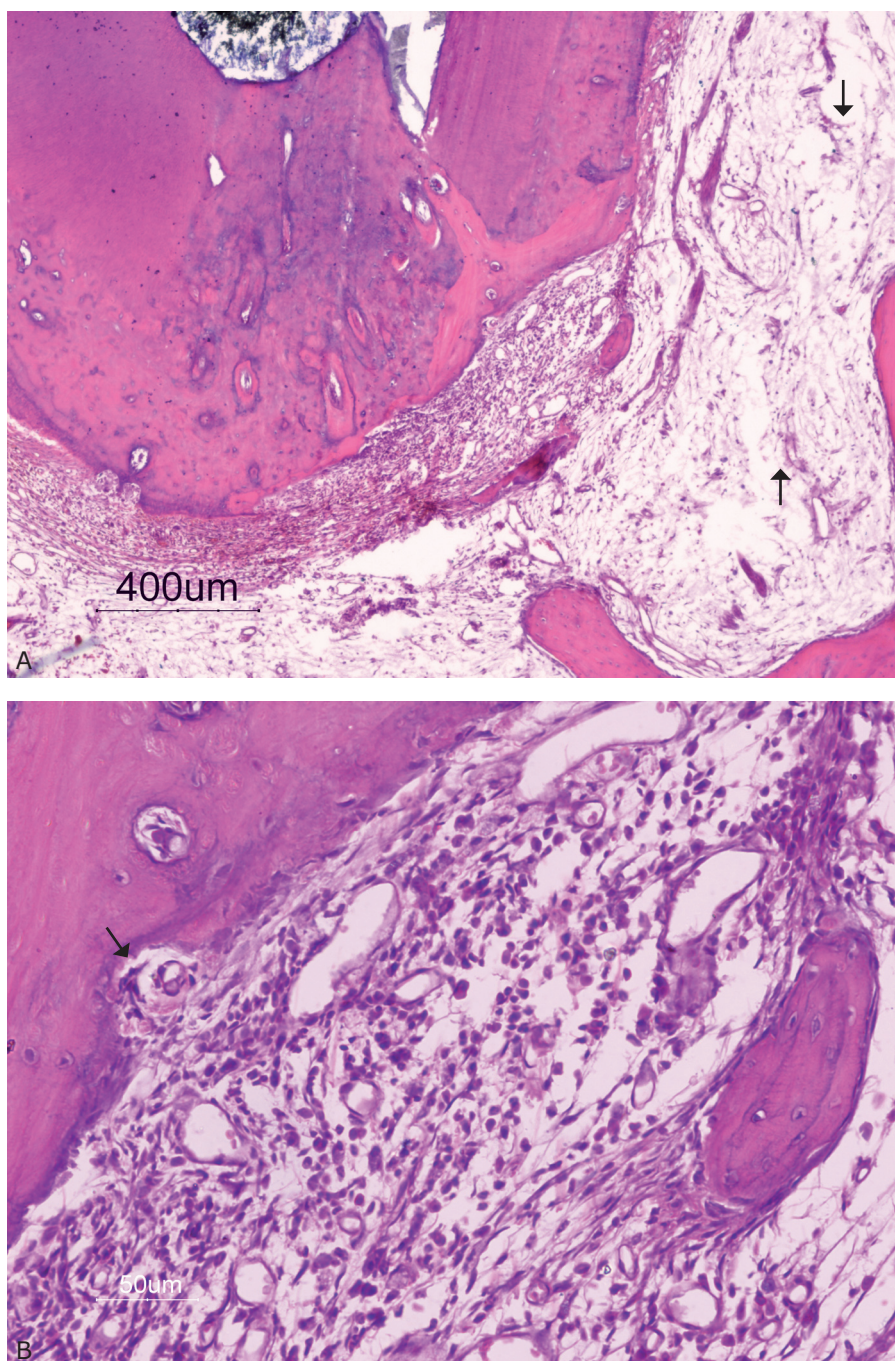


Figura 75 – Imagens de espécime do grupo de teste 1 com infiltrado inflamatório de intensidade grave. A) Espessamento do ligamento periodontal e “desorganização” do tecido adiposo medular (setas); B) Infiltrado com predomínio de células mononucleadas, neovasos e áreas de reabsorção radicular (seta).



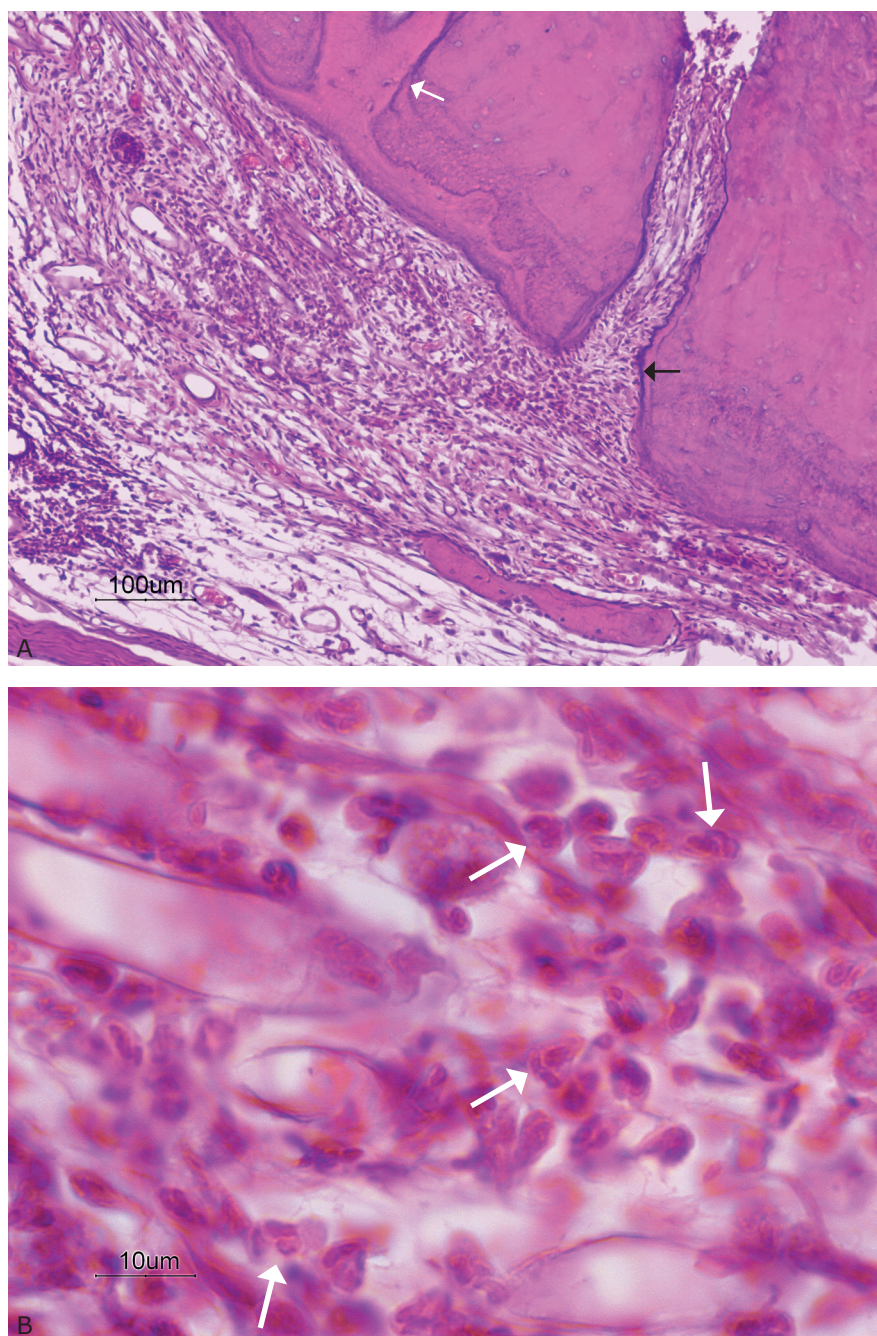


Figura 76 – Imagens de espécime do grupo de teste 1 com inflamação periapical de intensidade grave. A) Canal cementário preenchido por células do infiltrado inflamatório (seta preta) e *foramina* encerrado por cimento secundário (seta branca); B) Grande ampliação onde se podem observar células inflamatórias polimorfonucleares (seta branca), bem como abundância de neovasos.

GRUPO 2  
MEDICAÇÃO INTRACANALAR COM GEL DE CHX A 2%

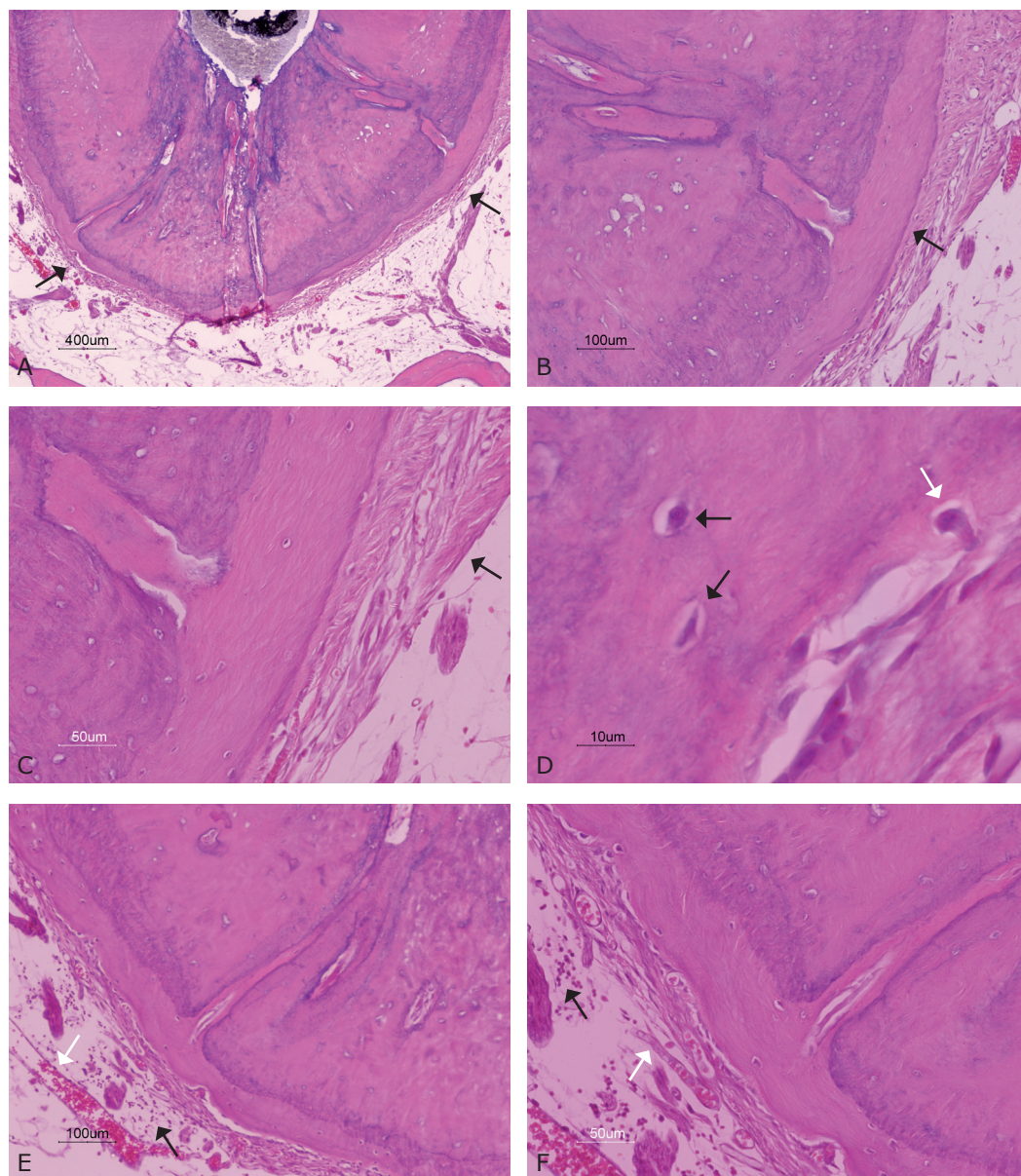


Figura 77 – Imagens de microscopia de luz de amostra com inflamação periapical de intensidade ligeira. A) e B) Evidenciam o encerramento apical completo com cimento secundário (setas pretas); C) Deposição de cimento secundário associada a uma área do ligamento periodontal livre de inflamação (seta preta); D) Cementócitos (setas pretas) e cementoblasto (seta branca) no interior do cimento secundário; E) e F) Foco de células inflamatórias (seta preta) e de neovasos (seta branca) na proximidade de *foramina* apical encerrado com cimento secundário.



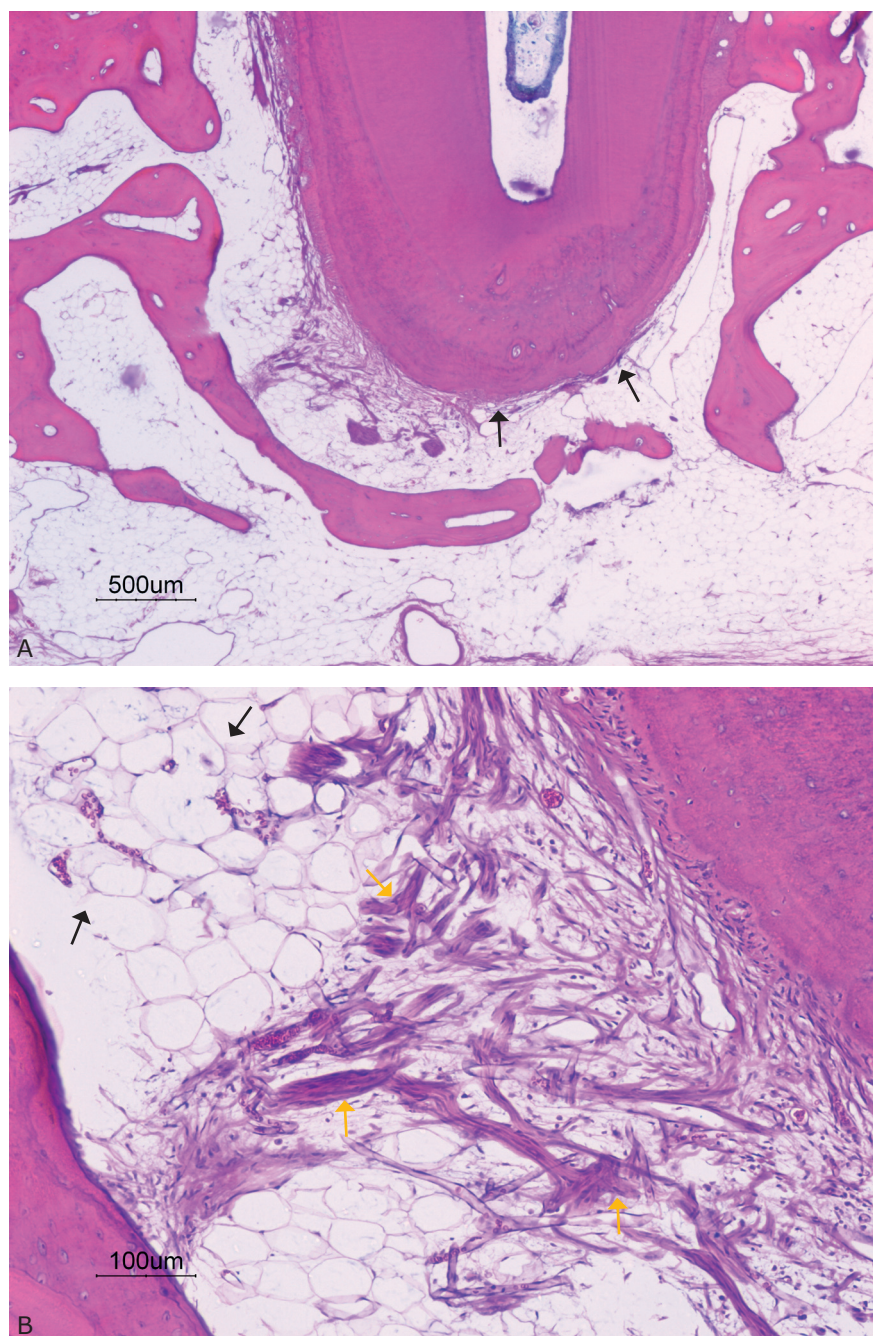


Figura 78 – Imagens de espécime do grupo de teste 2 com inflamação periapical ligeira. A) Intensa deposição de cimento secundário com encerramento apical (setas pretas) e manutenção da arquitectura do osso alveolar; B) Infiltrado inflamatório localizado na proximidade de área rica em tecido nervoso (setas amarelas), com a estrutura de tecido adiposo medular preservada (setas pretas).

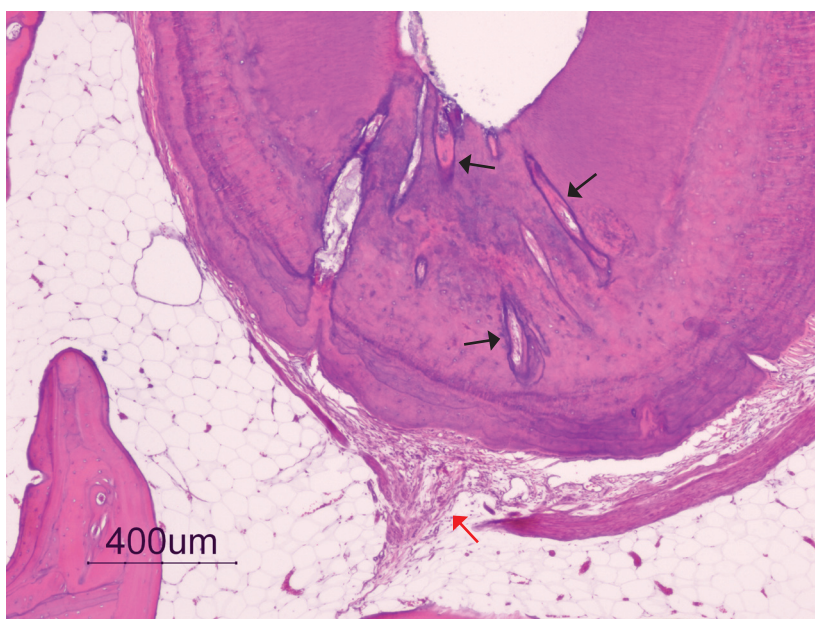


Figura 79 – Imagem de espécime do grupo de teste 2 com inflamação periapical ligeira. Obliteração parcial dos *foramina* com tecido duro (setas pretas), encerramento apical completo, múltiplas linhas de deposição de cimento secundário e infiltrado inflamatório (seta vermelha).

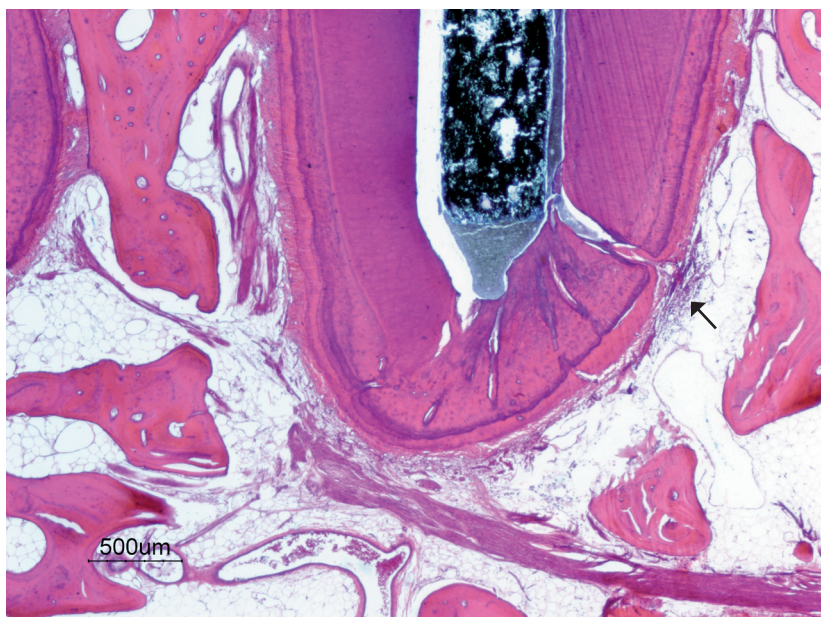


Figura 80 – Imagem de espécime do grupo de teste 2 com inflamação apical ligeira. Abundante formação de cimento secundário, com encerramento apical parcial e presença de infiltrado inflamatório localizado junto ao *foramen* apical (seta preta).

Das 65 amostras estudadas nesta série, 42 (64%) não apresentaram inflamação periapical, ao passo que 18 (28%) evidenciaram inflamação periapical de intensidade ligeira e 5 (8%) grave. Os casos de inflamação grave apresentaram um infiltrado inflamatório dominado pela presença de células mononucleadas, com alguns polimorfunucleares compatíveis com neutrófilos, basófilos e eosinófilos, bem como neovasos. Foi possível encontrar, na mesma amostra, áreas de reabsorção dos tecidos duros radiculares a coexistirem com sinais de intensa actividade de reparação com cimento secundário.

Verificou-se uma tendência geral para melhores resultados histológicos no grupo 1, com tratamento numa única sessão, traduzida pela ausência de inflamação periapical em 76% das amostras, contra apenas 53% do grupo 2. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa para um nível de significância de 95% ( $p=0,052$ ). Detectámos presença de células fagocitárias em 12% (4/33) das amostras do grupo 1 e em 22% (7/32) do grupo 2.

Não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre a espessura do ligamento periodontal no grupo 1 ( $302 \pm 71 \mu\text{m}$ ) e o grupo 2 ( $320 \pm 68 \mu\text{m}$ ) (Gráfico 9).

O grupo 2 apresentou uma área de formação de cimento secundário ( $7916 \pm 3680 \text{ pixel}$ ) estatisticamente superior ao grupo 1 ( $4970 \pm 2154 \text{ pixel}$ ) ( $p=000$ ).

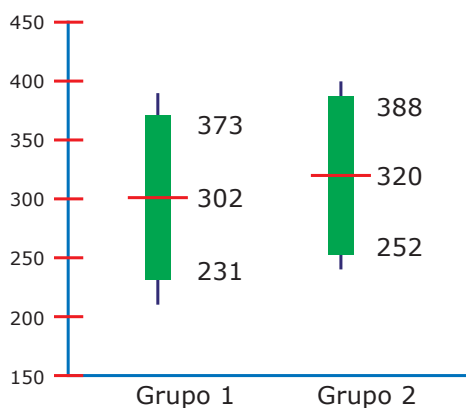


Gráfico 9 – Espessura do ligamento periodontal nos grupos teste



### 3.3.4. Intensidade da reacção inflamatória periapical

Fazendo uma análise global comparativa dos canais tratados numa única sessão (grupo 1) com os medicados com o gel de clorhexidina e obturados na segunda sessão (grupo 2), conjugando os grupos controlo negativo e teste, verificamos que 47% dos canais do grupo 2 apresentaram inflamação periapical, e que no grupo 1 esta foi observada em apenas 22%, o que representa um nível de inflamação estatisticamente superior para o grupo tratado em duas sessões ( $p=0,013$ ). Além disso, a histomorfometria revelou que o grupo 2 desenvolveu uma área de cimento secundário estatisticamente superior ao grupo 1 ( $p=000$ ).

Tabela 12 – Nível de inflamação periapical observada nos vários grupos em estudo

Grupo	Nº de raízes	Tratamento	Nível de inflamação periapical		
			0 (ausente)	1 (ligeira)	2 (grave)
<b>Controlo positivo</b>	12	Sem obturação	0	0	12 (100%)
<b>Controlo negativo</b>	15	Grupo 1	12 (80%)	3 (20%)	0
	14	Grupo 2(CHX)	8 (57%)	6 (43%)	0
<b>Experimental</b>	33	Grupo 1	25 (76%)	5 (15%)	3 (9%)
	32	Grupo 2(CHX)	17 (53%)	13 (41%)	2 (6%)

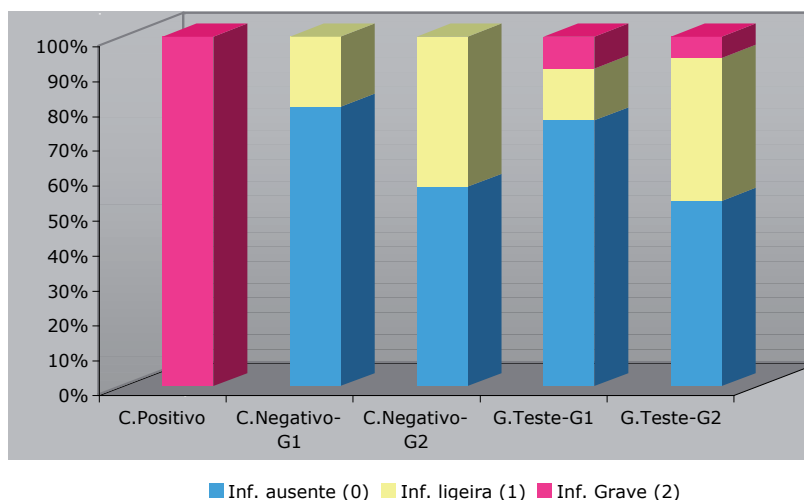


Gráfico 10 – Nível de inflamação periapical observada nos vários grupos em estudo

A análise global comparativa dos grupos controlo negativo e teste evidenciou um nível de inflamação de 32% para o primeiro e de 36% para o último. Não obstante, e apesar do grupo teste apresentar alguns casos de inflamação

grave (os quais não foram observados em nenhuma das amostras do grupo controlo negativo), a diferença verificada entre ambos não foi estatisticamente significativa ( $p=0,306$ ).

A área de cimento secundário formada nos grupos controlo negativo e teste também não apresentou diferença estatística ( $p=0,428$ ).

### 3.3.5. Encerramento dos *foramina* apicais, reabsorção dos tecidos duros e presença de células fagocitárias.

Tabela 13 – Percentagens de cada um dos níveis observados nos grupos para os parâmetros histomorfológicos encerramento dos *foramina* apicais, reabsorção dos tecidos duros e células fagocitárias

Parâmetro	Nível	Controlo positivo	Controlo negativo Grupo 1	Controlo negativo Grupo 2	Teste Grupo 1	Teste Grupo 2
Encerramento dos <i>foramina</i> apicais	0	0	93%	86%	88%	85%
	1	0	7%	14%	12%	15%
	2	100%	0	0	0	0
Reabsorção dos tecidos duros	0	0	100%	100%	88%	75%
	1	0	0	0	9%	12%
	2	100%	0	0	3%	3%
Células fagocitárias	0	0	87%	79%	88%	78%
	1	100%	13%	21%	12%	22%

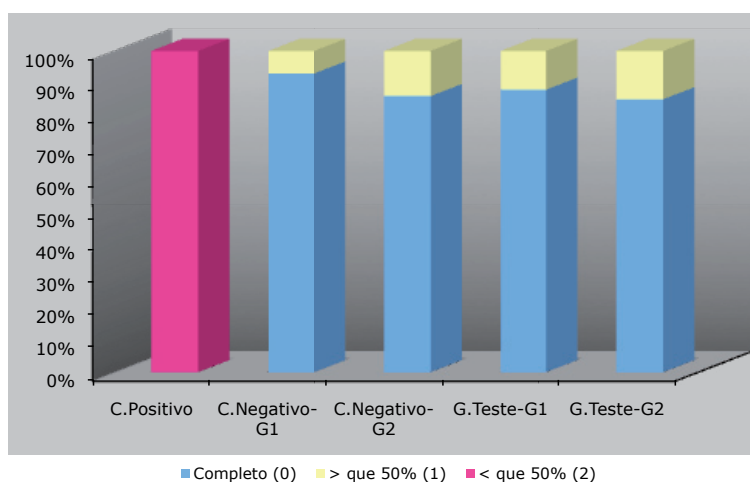


Gráfico 11 – Encerramento dos *foramina* apicais

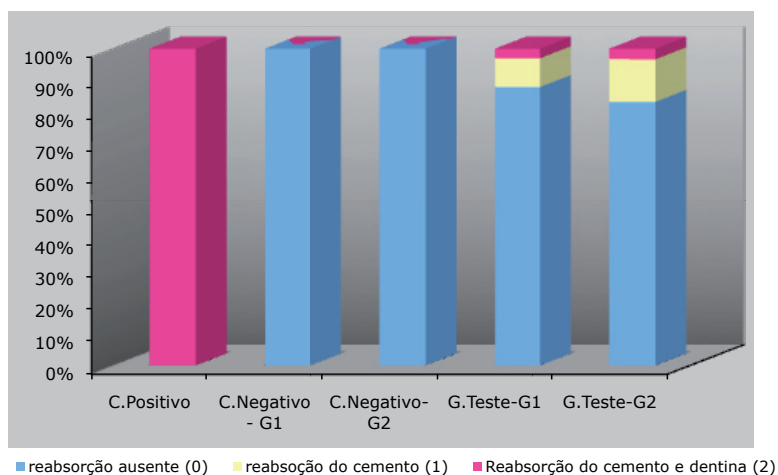


Gráfico 12 – Reabsorção dos tecidos duros

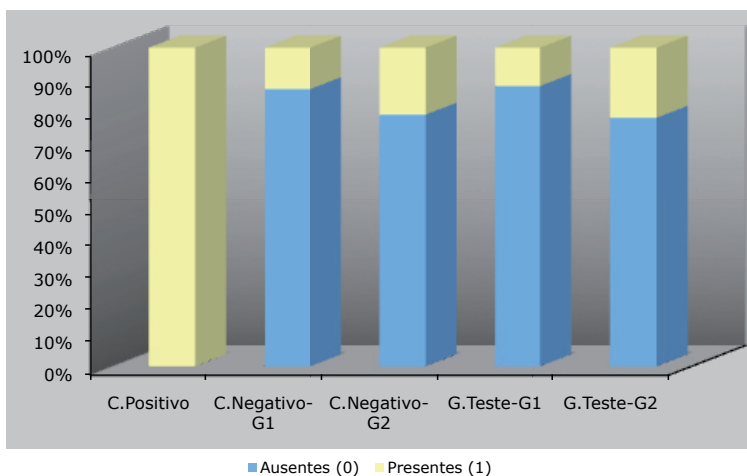


Gráfico 13 – Presença de células fagocitárias



### 3.4. Histomorfometria

Tabela 14 – Valores da análise histomorfométrica efectuada

Grupo	Tratamento	n	Ligamento periodontal		Neocemento	
			Espessura $\mu\text{m}$	Desvio padrão	Área (pixel)	Desvio padrão
<b>Controlo positivo</b>	Não obturado	12	600	$\pm 118$	n. e.	-
<b>Controlo negativo</b>	Grupo 1	15	301	$\pm 68$	5979	$\pm 3008$
	Grupo 2	14	310	$\pm 97$	7895	$\pm 2290$
<b>Teste</b>	Grupo 1	33	302	$\pm 71$	4970	$\pm 2154$
	Grupo 2	32	320	$\pm 68$	7916	$\pm 3680$

n.e. – não efectuada devido a um predomínio do padrão de reabsorção radicular observado neste grupo.

#### 3.4.1 Espessura do ligamento periodontal

Constatou-se a existência de uma correlação estatisticamente significativa e directa entre a espessura do ligamento periodontal e o nível de inflamação das amostras. O valor médio de espessura encontrado em raízes sem inflamação periapical foi de 279  $\mu\text{m}$ , com inflamação ligeira de 323  $\mu\text{m}$  e com inflamação grave de 496  $\mu\text{m}$ .

#### 3.4.2 Área de cimento secundário

Quer no grupo controlo negativo, quer no grupo teste, verificou-se um aumento estatisticamente significativo da área de cimento secundário formada nas raízes tratadas com clorhexidina a 2%.

O facto de termos constatado uma maior deposição de cimento secundário em raízes tratadas em duas sessões, com medicação intracanal com clorhexidina, e estas apresentarem simultaneamente uma maior incidência de inflamação ligeira, levou-nos a procurar se existia uma correlação entre a sua presença e um aumento da área de cimento secundário depositada, tendo-se verificado que existe uma associação directa e estatisticamente significativa entre os dois parâmetros (Mann-Whitney  $p=0,43$ ).

### 3.5. Amostras com extravasamento apical de material de obturação

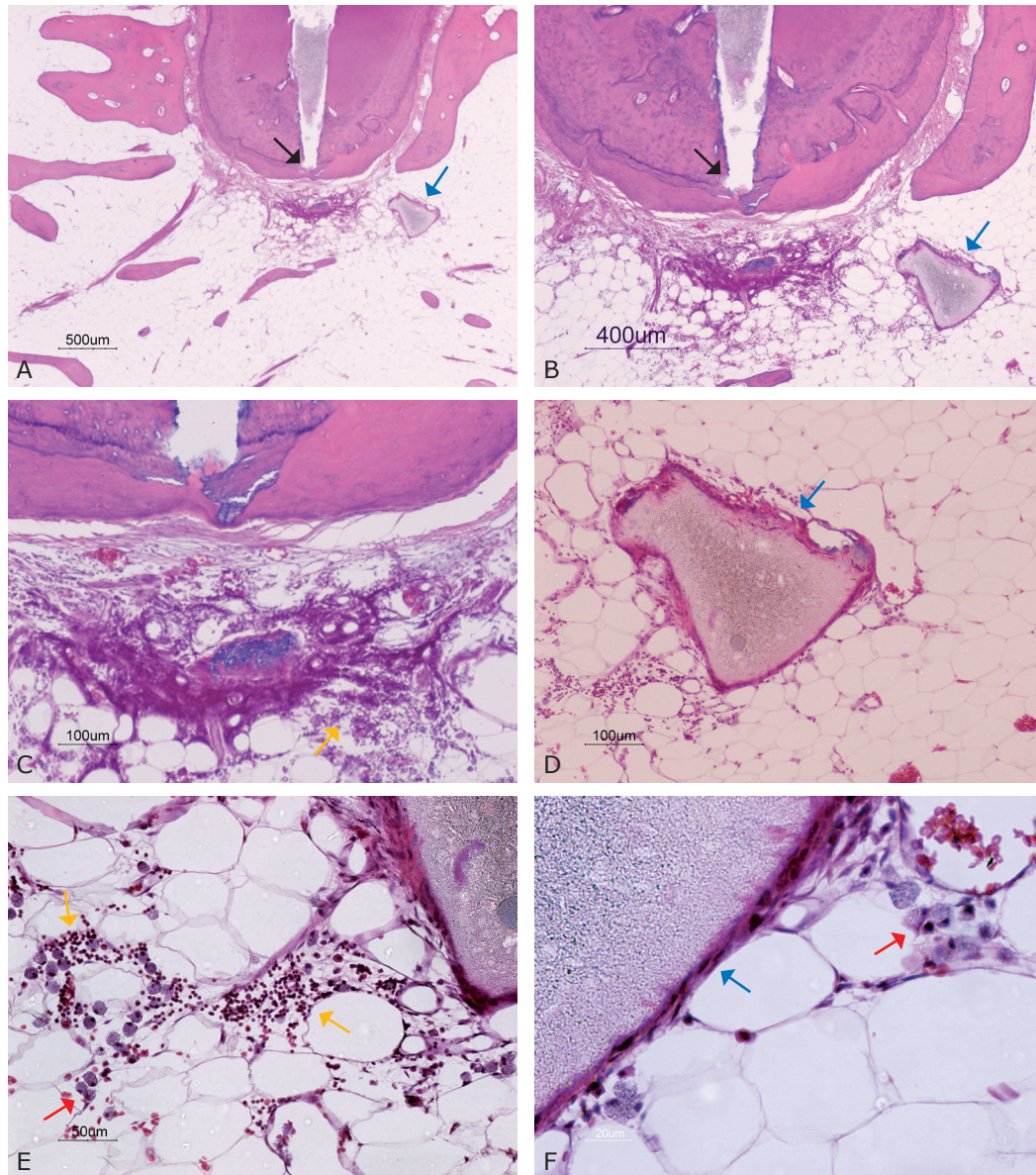


Figura 81 – Imagens de microscopia de luz de amostra com extravasamento de cimento endodôntico Epiphany™ para os tecidos peripicais, proporcionado por sobreinstrumentação canal. A e B) Grande deposição de cimento secundário na proximidade da zona sobreinstrumentada (seta preta) e aglomerado de Epiphany™ (seta azul) nos tecidos periapicais; C) Área de infiltrado inflamatório denso (seta amarela); D) Cápsula de tecido fibroso (seta azul) a rodear o cimento endodôntico Epiphany™ extravasado, com células inflamatórias na proximidade; E) e F) pormenor da cápsula (seta azul), das células inflamatórias mononucleadas (seta amarela) e dos macrófagos (seta vermelha). H&E.



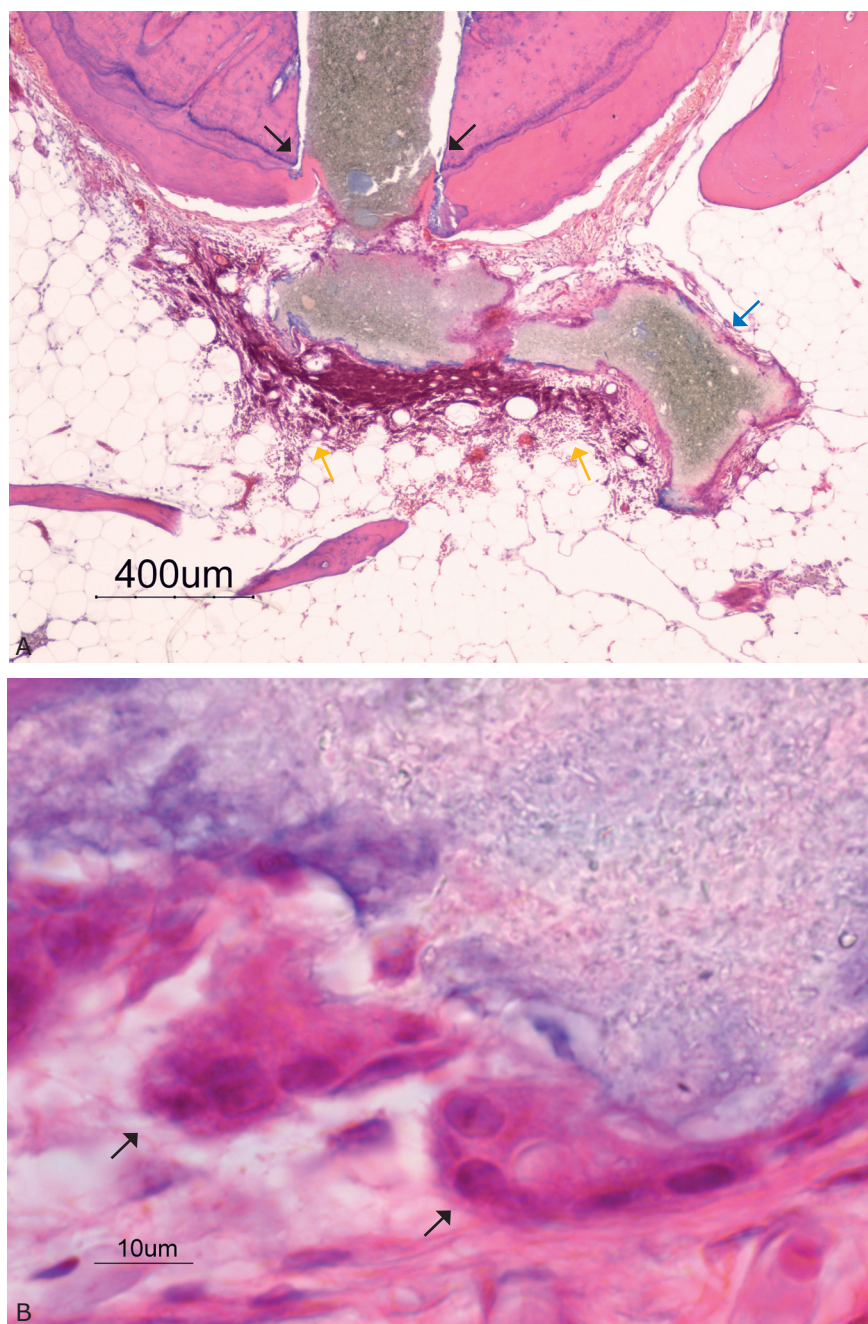


Figura 82 – Imagens de microscopia de luz de corte seriado da mesma amostra da figura anterior, distanciado cerca de 100µm. A) Evidencia a destruição do cimento apical causada pela sobreinstrumentação (setas pretas) e o cimento endodôntico Epiphany™ extravasado (seta azul) rodeado por infiltrado inflamatório (setas amarelas); B) Células gigantes de corpo estranho (setas pretas) na margem do cimento Epiphany™ extravasado. H&E.

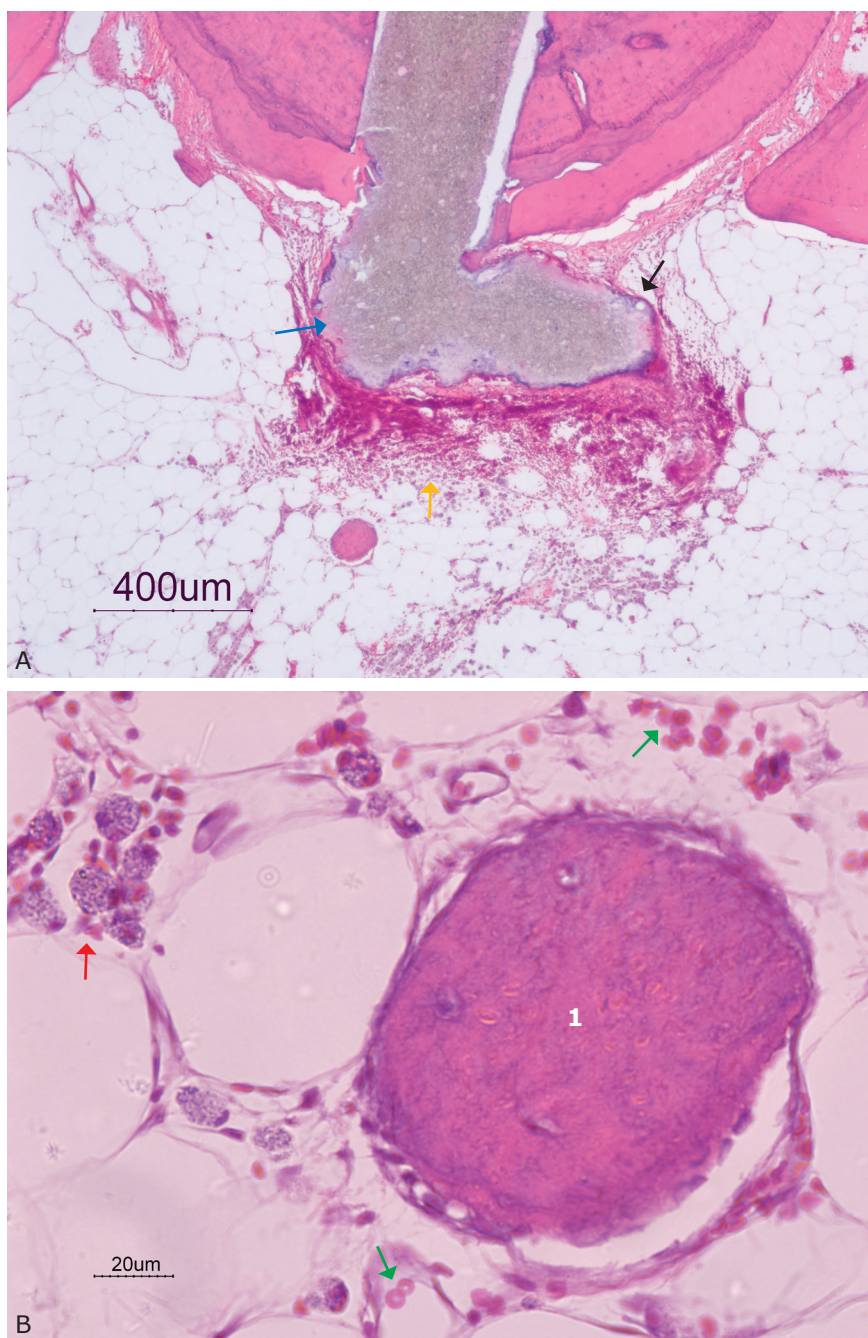


Figura 83 – Imagens de microscopia de luz de corte seriado da mesma amostra das figuras anteriores distanciadas cerca de mais 100µm. A) Cápsula fibrosa (seta preta) a contornar o material extravasado (seta azul) com infiltrado inflamatório na proximidade (seta amarela); B) Pormenor de fragmento de cimento celular (1) deslocado para os tecidos periapicais pela sobreinstrumentação canal, macrófagos (seta vermelha) e eritrócitos (seta verde). H&E.



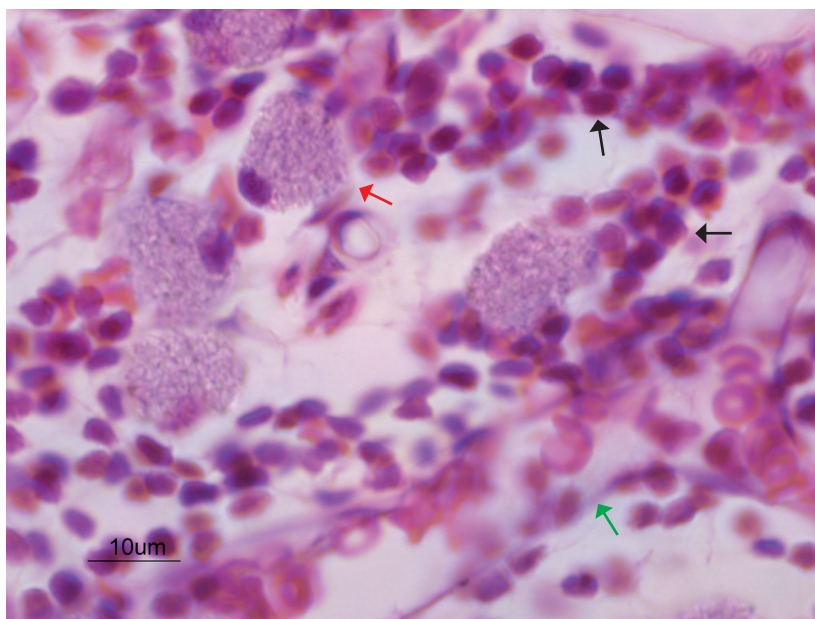


Figura 84 – Imagem de microscopia de luz evidenciando células inflamatórias mononucleadas (setas pretas), macrófagos com sinais compatíveis com a fagocitose de Epiphany™ (seta vermelha), nas proximidades de vaso sanguíneo (seta verde). H&E.

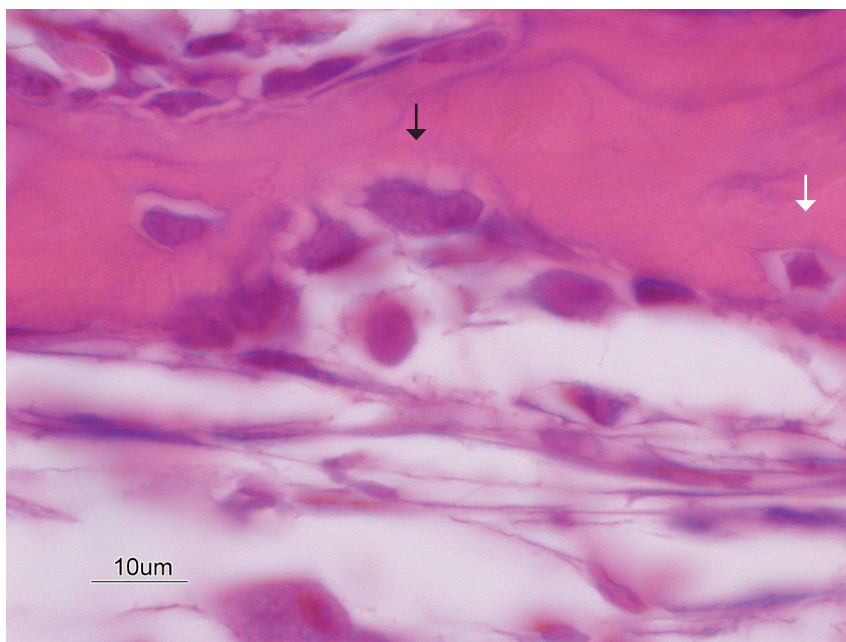


Figura 85 – Imagem de microscopia de luz evidenciando a presença de reabsorção activa no osso alveolar da região periapical. Trabécula óssea, osteócito (seta branca) e osteoclasto (seta preta).

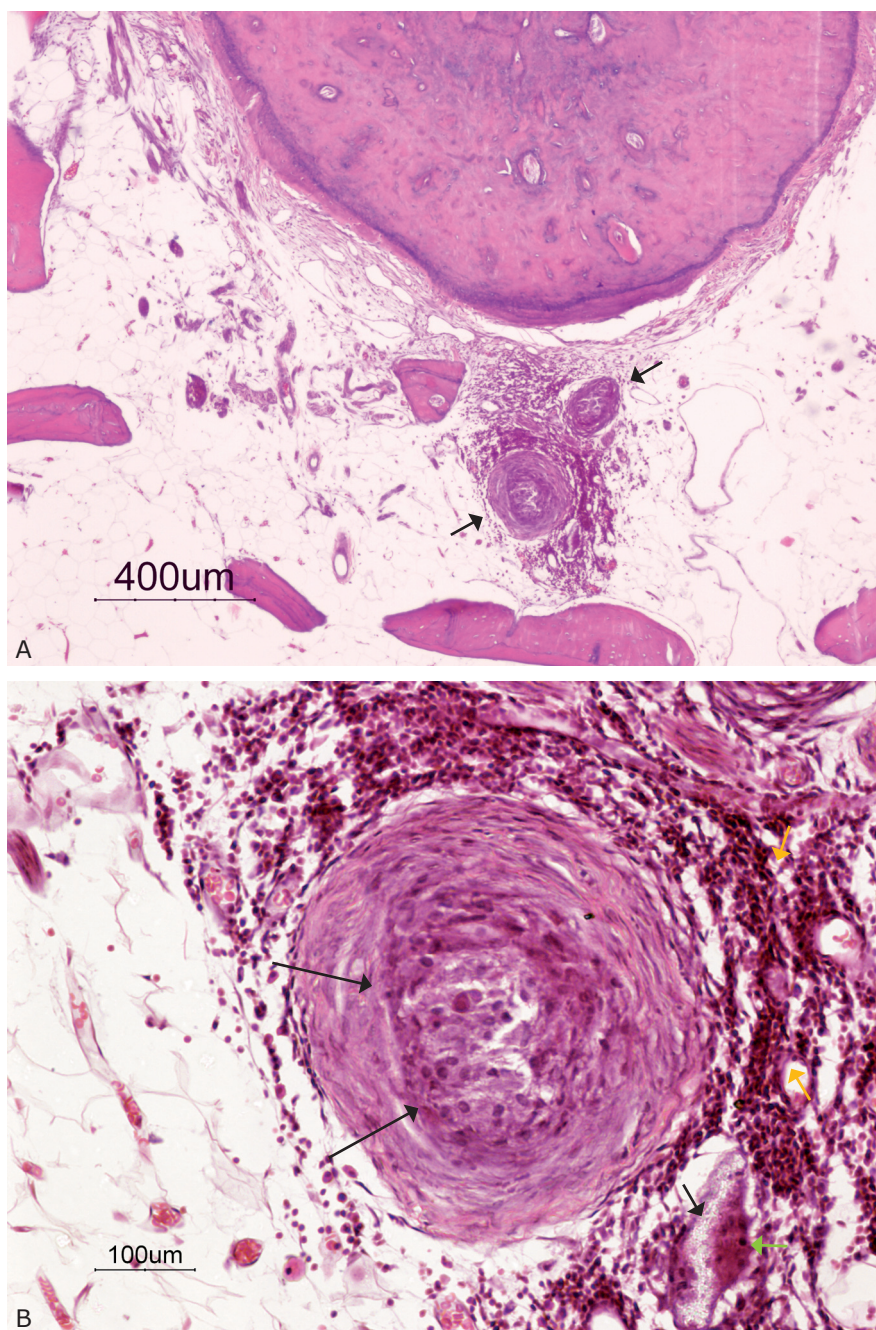


Figura 86 – Imagem de microscopia de luz de amostra com extravasamento de Epiphany™. A) Reacção inflamatória localizada em redor de dois aglomerados de Epiphany™ extravasado nos tecidos periapicais (setas pretas); B) Corte tangencial da cápsula de tecido fibroso organizada em torno do material extravasado (setas pretas), grande aglomerado de células inflamatórias mononucleadas (setas amarelas) e célula gigante de corpo estranho (seta verde). H&E.



A observação ao microscópio óptico permitiu confirmar os 3 casos de extravasamento apical reconhecidos radiograficamente, e identificar mais 10 novos casos de presença de quantidades ínfimas de cimento endodôntico Epiphany™ nos tecidos periapicais.

O extravasamento de cimento endodôntico ocorreu em 12% dos casos (13/107), não obstante, apenas se constatou sobreinstrumentação prévia num deles, tendo-se verificado passagem do material através dos *foramina* apicais abertos em todos os outros. A presença de material nos tecidos periapicais evocou sistematicamente em seu redor uma reacção inflamatória. Observou-se a formação de uma cápsula fibrosa organizada em torno do material, sempre ladeada por um infiltrado inflamatório crónico, com predomínio de linfócitos e plasmócitos.

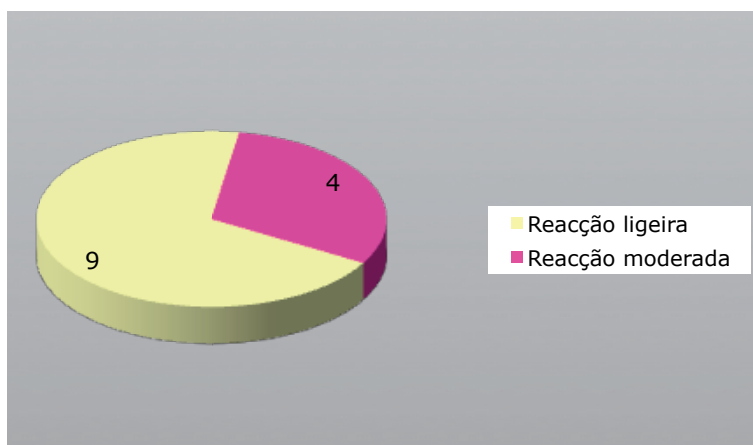


Gráfico 14 – Intensidade da reacção tecidular ao material extravasado para os tecidos periapicais

De acordo com o sistema de graduação apresentado para a resposta ao material extravasado, 9 dos espécimes apresentaram uma reacção de intensidade ligeira, caracterizada pela presença de uma cápsula de tecido fibroso bem organizada e fina, acompanhada de infiltrado de células inflamatórias mononucleadas, linfócitos e plasmócitos. Foi possível observar em todos os espécimes a presença de macrófagos, com sinais sugestivos de fagocitose de partículas de cimento. Esta reacção ao material extravasado ocorreu sem perturbar significativamente a arquitectura dos tecidos periapicais adjacentes.

Nos 4 espécimes restantes, foi observada uma reacção de intensidade moderada, com formação de uma cápsula fibrosa organizada, densa e mais espessa, associada a infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleadas, bem como alguns polimorfonucleares dispersos pela área adjacente.

Na proximidade da cápsula visualizou-se um aumento do número de vasos, com sinais sugestivos de hiperémia. Esta reacção surgiu associada aos casos em que a quantidade de material extravasado foi superior, encontrando-se sempre células gigantes multinucleadas na periferia do material extravasado. A quantidade de macrófagos presente nos casos de reacção de corpo estranho foi bastante significativa, sendo observados não só na proximidade do material como dispersos até pelo menos 2 milímetros de distância da periferia da cápsula. Foi possível detectar sinais de elevada actividade osteoclástica e osteoblástica nas trabéculas situadas na proximidade do material extravasado.

No espécime com sobreinstrumentação observaram-se sinais de intensa deposição de cimento secundário, em redor da área de perfuração do cimento apical, de tal modo significativa que nalguns dos cortes seriados efectuados, paralelos à zona de maior diâmetro da perfuração, foi possível registar imagens com o ápice completamente encerrado. Este facto serve para salientar importância de efectuar cortes seriados, por forma a obter uma correcta avaliação tridimensional da resposta histopatológica presente em cada uma das amostras.

## 4. Discussão

A periodontite apical é fundamentalmente uma sequela da infecção do espaço pulpar e representa um problema de saúde pública bastante generalizado (Figdor e Sundqvist 2007). Os estudos epidemiológicos disponíveis revelam que aos 50 anos, 1 em cada 2 indivíduos já desenvolveram esta patologia, aumentando a sua prevalência ainda mais com o avançar da idade, verificando-se que acima dos 60 anos atinge 70% da população (Eriksen 2008). O tratamento desta patologia, realizado em meio académico por profissionais com treino especializado, de acordo com a *legis artis*, permite atingir taxas de sucesso clínico e radiográfico, após 4 a 6 anos, na ordem dos 80% (Marquis *et al.* 2006). Em contrapartida, o prognóstico expectável para a terapêutica instituída por médicos dentistas generalistas fica aquém destes valores, situando-se, grosso modo, em torno dos 70% (Eriksen 2008), o que provavelmente resulta de uma menor preparação científica e técnica, com impacto na qualidade final do tratamento executado. Em qualquer dos casos, mesmo considerando o cenário mais optimista, é notável o caminho que ainda se pode e deve percorrer no sentido de otimizar os resultados do tratamento endodôntico, de modo a aumentar a sua previsibilidade, eficácia e prognóstico a longo prazo.

Nos últimos anos tem-se verificado um notável progresso dos aspectos técnicos relacionados com a instrumentação canal, bem como dos fundamentos biológicos que explicam a manutenção ou o aparecimento de patologia periapical pós-tratamento endodôntico. É actualmente reconhecido pela comunidade científica que a infecção, por bactérias e fungos, é o factor etiológico crítico dos insucessos (Molander *et al.* 1998; Sundqvist *et al.* 1998; Sunde *et al.* 2002;

Nair *et al.* 2005). Por conseguinte, a sua prevenção e tratamento consistem, fundamentalmente, numa questão de resolução clínica de um problema microbiológico (Peters 2002). A ausência de microrganismos cultiváveis a partir do canal radicular, no momento que precede a obturação, é um factor decisivo para o bom prognóstico do tratamento endodôntico (Sjögren *et al.* 1997). Porém, ainda é bastante controverso se será ou não possível reduzir, numa só consulta, a quantidade de microrganismos até um nível que permita a regeneração periapical, ou se será mais eficaz a utilização de um antisséptico intracanal, durante alguns dias, seguido da obturação numa consulta posterior (Peters 2002; Law e Messer 2004; Nair *et al.* 2005). Contudo, independentemente de dentro de alguns anos chegarmos a um consenso em relação a este tema, irão continuar a existir situações clínicas com particularidades técnicas e anatómicas que implicam o recurso ao tratamento em múltiplas sessões. Nestes casos, a presença de medicação no interior dos canais é justificada pela apresentação de benefícios, tais como: a eliminação do espaço que poderia vir a ser ocupado por fluidos tecidulares, a redução adicional dos microrganismos que resistiram à preparação biomecânica (Siqueira *et al.* 2007), a dissolução de restos de tecido orgânico e, no caso da cloroheixidina, a ligação à dentina permitindo a sua libertação gradual em concentrações efectivas contra o desenvolvimento microbiano (Rosenthal *et al.* 2004).

A capacidade antimicrobiana da cloroheixidina já se encontra bastante estudada e entende-se que o seu espectro de acção é adequado à sua utilização como solução de irrigação ou medicação intracanal (Ørstavik e Haapasalo 1990; Jeanson e White 1994; Basrani *et al.* 2003; Vianna *et al.* 2004; Schafer e Bossmann 2005). Por outro lado, a sua substantividade antimicrobiana já foi descrita em diversos estudos *in vitro*, cujos resultados demonstraram que esta substância permitiu impedir ou reduzir o crescimento microbiano por períodos de 72 horas (Siren *et al.* 2004), 21 dias (Basrani *et al.* 2002) ou até 12 semanas após a sua remoção do canal (Rosenthal *et al.* 2004). Estes resultados são corroborados pelo nosso estudo *in vitro*, anteriormente apresentado, onde foi possível observar melhores resultados para os espécimes tratados com cloroheixidina e sujeitos à microinfiltração coronária por um período de 80 dias. Contudo, a extrapolação de resultados dos estudos *in vitro* para a situação clínica tem de ser feita com a devida prudência, pelo que se tornava pertinente testar a substantividade antimicrobiana da cloroheixidina num modelo experimental *in vivo*.

Para a elaboração deste projecto foram tomados em consideração estudos já publicados, realizados em condições semelhantes, que permitissem a compa-

ração dos resultados obtidos. A origem do protocolo experimental do trabalho por nós desenvolvido derivou dos estudos com modelos experimentais *in vivo*, utilizando o cão, para avaliação da biocompatibilidade dos materiais de obturação canal (Holland e de Souza 1985; Katebzadeh *et al.* 1999; Leonardo *et al.* 1999; Berbert *et al.* 2002; Tanomaru Filho *et al.* 2002; Holland *et al.* 2003). De especial relevo para a génese deste protocolo, devemos referir o modelo desenvolvido pelo grupo de Shimon Friedman, que visa a avaliação da eficácia funcional de materiais e técnicas de obturação a longo prazo. Este modelo permite avaliar a biocompatibilidade dos materiais de obturação e, simultaneamente, testar a sua eficácia na prevenção do desenvolvimento de periodontite apical causada por microinfiltração coronária de microrganismos pós-obturaç o (Friedman *et al.* 1997; Friedman *et al.* 2000; Mah *et al.* 2003).

Outro aspecto que considerámos para a escolha do cão, como modelo experimental, encontra-se relacionado com a cronologia a que deve obedecer um trabalho desta natureza. Se, por um lado, é desejável que o animal seja do ponto de vista biológico, anatómico e funcional, semelhante ao Homem, também é importante que o seu ciclo biológico permita um período experimental razoavelmente breve. Nesse sentido, a escolha do cão foi realizada tendo em consideração estudos prévios, que estabeleceram a equivalência entre a idade do cão e a do homem. Nesta escala, um cão de 1 ano, corresponde à idade de 15 anos e o de 2 a um Homem de 24 anos. Daí em diante, a cada aumento de um ano de idade no cão equivalem quatro anos de idade no homem (Lebeau 1953). Além disso, devemos considerar a raça, pois diferentes raças da mesma espécie animal podem ter características anatómicas e fisiológicas distintas. O cão é uma espécie com grande diversidade de raças, razão pela qual os cães de laboratório utilizados em trabalhos experimentais devem pertencer à mesma raça, ser de origem pura e do mesmo sexo, de modo a reagirem de forma semelhante a um determinado estímulo, permitindo assim a reprodutibilidade dos resultados. Neste projecto todos os animais utilizados pertenciam à raça Beagle, de linhagem pura, nascidos e criados num laboratório credenciado, de sexo feminino e com idade compreendida entre os 20 e os 27 meses no início do estudo. A idade reveste-se de particular importância pois os 2º, 3º e 4º pré-molares erupcionam por volta do 150º dia de vida, e o último dente, o 3º molar, por volta do 175º (Shabestari *et al.* 1967). Daí em diante o desenvolvimento radicular continua, completando-se o processo de apexogénese nos meses seguintes e a deposição de dentina e cemento secundários prolongam-se por toda a vida. Por conseguinte, ocorre uma diminuição progressiva do diâmetro do canal radicular

e da área de comunicação com o ligamento periapical, através do delta apical, o que confere uma diminuição do risco de extravasamento de materiais para os tecidos periapicais à medida que aumenta a idade do animal.

O número de animais a utilizar neste ensaio experimental foi definido tendo em consideração vários parâmetros, entre eles: a necessidade de uma amostra com dimensão que permitisse uma análise estatística apropriada, a minimização possível do número de animais envolvidos e também dos custos totais do projecto de investigação. A dimensão da amostra, isto é, o número de canais a tratar em cada grupo, foi determinada com base na incidência de inflamação encontrada em estudos anteriores e partindo do pressuposto de se encontrar uma diferença de 20% entre as duas modalidades de tratamento, tendo em vista a utilização do teste do qui-quadrado, para um nível de significância de 95% e um poder de 80%. O rigor científico conduziu-nos à escolha dos pré-molares, birradiculares, de modo a poder realizar dois tratamentos no mesmo dente, porquanto assim ambos os grupos ficaram sujeitos a condições biológicas semelhantes. Esta decisão condicionou o número máximo de dentes utilizável em cada animal a 10, sendo a sua totalidade incluída no desenho experimental final.

A existência de provas científicas sólidas sobre o desenvolvimento de lesões apicais em dentes com exposição da polpa à flora oral (Kakehashi *et al.* 1965; Moller *et al.* 1981; Pascon *et al.* 1987; Friedman *et al.* 1997; Friedman *et al.* 2000), levou-nos a ponderar seriamente a não inclusão de um controlo positivo no protocolo experimental. Seria lícito basearmo-nos no controlo histórico como outros investigadores fizeram e, *à priori*, salvaguardaria o Bem-Estar animal. Contudo, em alguns trabalhos recentes, que optaram por esta solução, não houve desenvolvimento de inflamação periapical de intensidade acima de ligeira em nenhuma das amostras (Mah *et al.* 2003; Shipper *et al.* 2005). Perante este cenário, algumas dúvidas se levantaram como, se o método de inoculação utilizado foi adequado, se a patogenicidade da flora oral presente nesses animais seria menor ou, por outro lado, uma resposta inflamatória do hospedeiro diferente poderiam justificar os resultados observados, ao invés de um melhor desempenho dos materiais testados. Por este motivo, optámos pela inclusão de um controlo positivo em cada animal, um prémolar superior, com anatomia e desenvolvimento semelhantes aos restantes dentes em estudo, com o pressuposto de que se fossem observados sinais clínicos de infecção estes dentes seriam extraídos, por forma a evitar o sofrimento desnecessário dos animais. Tais sinais clínicos não se verificaram em nenhum dos animais e mesmo as radiotransparências apicais desenvolvidas foram discretas. Não obstante, histologicamente todos



os canais do grupo desenvolveram inflamação periapical grave e com padrões de reabsorção radicular com uma intensidade não observada em nenhum dos canais obturados, permitindo por isso ter um referencial claro de comparação. Esta falta de correlação entre a radiologia convencional e a histologia, com um poder discriminativo da existência de patologia apical sempre menor para a primeira, é corroborada por outros estudos (Brynolf 1967; Green *et al.* 1997; Ricucci *et al.* 2006).

A realização da técnica de Brown e Brenn para detecção de bactérias no interior dos canais radiculares, executada com controlo positivo, não permitiu a visualização de colónias bacterianas em nenhuma das amostras. No entanto, o elevado número de falsos negativos descritos com esta técnica, nomeadamente quando a quantidade de bactérias presente é baixa, impede que se possa excluir a sua presença e a actividade microbiana (Nair *et al.* 1990). Entre os factores que podem justificar a dificuldade de visualização das bactérias nos cortes histológicos, destacamos os seguintes: a possibilidade de uma parte substancial das bactérias originais poderem ser removidas pelos próprios processos de preparação laboratorial das amostras; a dificuldade em pigmentar especificamente as bactérias Gram-negativas e, o facto das técnicas de coloração possibilitarem a pigmentação de apenas um pequeno número das bactérias presentes. Em relação a este último ponto, um estudo de Wijnbergen e colaboradores demonstrou que a sequência de armazenamento e fixação com formaldeído neutro, seguida da desmineralização com EDTA ou ácido fórmico, produz uma redução muito significativa na quantidade de bactérias Gram-positivas identificáveis, potenciando o registo de falsos negativos. Esta redução foi mais acentuada para o ácido fórmico do que para o EDTA, verificando-se que para o primeiro apenas foi identificada uma bactéria por cada quinze presentes, enquanto que o último possibilitou identificar uma proporção de cinco para quinze (*cit in* Ramos 2007). No nosso trabalho, a utilização de solução de Morse com um conteúdo significativo de ácido fórmico, poderá ter contribuído para a impossibilidade de detecção das bactérias. O facto de não efectuarmos para cada amostra a coloração de vários cortes seriados também contribuiu para diminuir as probabilidades da sua visualização.

O modelo seleccionado permite simular a microinfiltração coronária, uma situação clínica responsável pelo desenvolvimento de periodontite periapical pós-tratamento (Saunders e Saunders 1994), experimentalmente recriada através da inoculação de microrganismos na câmara pulpar dos dentes do grupo teste. No modelo inicial, o método utilizado com este fim consistiu na remoção de placa bacteriana autóloga e a sua colocação no interior da câmara pulpar,

numa única intervenção (Friedman *et al.* 1997; Friedman *et al.* 2000; Mah *et al.* 2003). O grupo de Martin Trope modificou o método e realizou 3 inoculações sucessivas intervaladas por um mês (Shipper *et al.* 2005). Por outro lado, Mário Leonardo e colaboradores expuseram a câmara pulpar directamente ao meio oral durante 3 meses (Leonardo *et al.* 2007).

No presente estudo, antes de efectuarmos a exposição do grupo teste à flora oral, aguardámos 3 semanas após a obturação canal, de modo a permitir a polimerização completa dos materiais, bem como um tempo de recuperação dos animais dos procedimentos operatórios prévios. Após este período a restauração coronária foi removida e os canais expostos à saliva durante uma semana. O objectivo deste procedimento foi facilitar o estabelecimento inicial dos microrganismos, promovendo a possível hidrólise enzimática superficial da policaprolactona (Tay *et al.* 2005; Tay *et al.* 2005) e a infiltração salivar ao longo de eventuais falhas na zona híbrida (Tay *et al.* 2005), fomentando condições para o sucesso da posterior colonização microbiana. Após este período, inoculámos os canais com placa autóloga removida do sulco gengival dos dentes molares e realizámos uma nova restauração coronária. Esta metodologia encontra suporte científico num estudo publicado recentemente, no qual a exposição dos canais radiculares, durante uma semana, seguidos da restauração coronária, permitiu induzir lesões periapicais com maior previsibilidade e intensidade do que deixar a cavidade pulpar completamente aberta durante um período de 3 meses. Uma explicação possível prende-se com o facto de, ao restaurar o dente após uma semana, serem criadas condições ecológicas que favorecem o desenvolvimento de espécies anaeróbias obrigatórias, com um perfil de patogenicidade mais elevado. Estas representaram 65% das estirpes isoladas nos dentes em que foi efectuada restauração coronária, pertencendo as bactérias mais frequentemente identificadas nestes canais aos géneros *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* e *Porphyromonas* (Ferreira *et al.* 2006). A flora encontrada nos canais radiculares de cães inoculados por este método assemelhou-se sobremaneira à que se encontra em canais de dentes humanos portadores de periodontite apical.

No nosso trabalho introduzimos ainda outras modificações em relação ao modelo originalmente publicado. Primeiro, a preparação radicular foi feita por instrumentação mecânica e finalizada com instrumentos manuais, com alargamento dois números acima do diâmetro apical determinado para o canal, variando a preparação apical final entre o tamanho 40 e 60, consoante os dentes, e não indiscriminadamente até ao número 40 como noutros estudos (Friedman *et al.* 1997; Friedman *et al.* 2000). Não obstante, ainda assim podemos constatar his-

tologicamente a presença de restos de tecido pulpar na região apical de alguns canais. Se bem que clinicamente foi perceptível um maior diâmetro dos canais em animais com menor idade, não houve qualquer problema de controlo da hemorragia no final da preparação biomecânica. Segundo, nos estudos referidos a restauração coronária foi realizada com um ionómero de vidro autopolimerizável (Friedman *et al.* 1997), com amálgama (Friedman *et al.* 2000) e com compómero (Mah *et al.* 2003), apresentando estas opções sempre o grave problema de, no final do período experimental, vários dentes terem sido alvo de fracturas ou perda da restauração coronária. Esta ocorrência comprometeu os resultados dos controlos negativos por sujeitar também estes dentes à exposição microbiana, desejada apenas no grupo teste, deixando por isso de poderem servir como referência comparativa. No nosso trabalho utilizámos um ionómero de vidro de dupla polimerização, o Photac Fill™, não se verificando qualquer falha em nenhuma das restaurações do grupo controlo negativo, até ao final período experimental, ou seja, durante 7 meses.

A eficácia clínica do material de obturação Epiphany™/Resilon™ foi avaliada numa modalidade de tratamento em sessão única ou em duas sessões, após a medicação intracanal com um gel de clorhexidina a 2%.

Os controlos negativos foram introduzidos para permitirem aferir a resposta inflamatória aos procedimentos cirúrgicos e à toxicidade dos materiais utilizados, possibilitando a comparação com o grupo teste, onde avaliámos a capacidade da obturação canal ar resistir à microinfiltração coronária.

A incidência global de inflamação observada no grupo controlo negativo foi de 31% e no grupo teste de 35%, valores que não apresentam uma diferença estatisticamente significativa. No entanto, no controlo negativo todos os casos de inflamação observados apresentaram intensidade ligeira, ao passo que 8% dos casos do grupo teste apresentaram inflamação de intensidade grave, facto que poderá ser considerado clinicamente relevante.

Estes resultados devem ser comparados com o primeiro estudo de avaliação do sistema Epiphany™/Resilon™, publicado pelo grupo de Martin Trope, no qual as raízes do controlo negativo não apresentaram inflamação, surgindo no grupo teste manifestações de inflamação de intensidade ligeira em apenas 17% dos casos, mas sem nenhum caso reportado de inflamação grave. Estes resultados foram interpretados, pelos autores, como prova científica de que este sistema forma um “monobloco” com adesão à parede de dentina, totalmente eficaz contra a infiltração coronária de microrganismos (Shipper *et al.* 2005).

Todavia, sublinhamos que a amostra em estudo foi de apenas 3 raízes no grupo controlo negativo e de 21 no grupo teste, dimensão substancialmente inferior à estudada no presente trabalho, que foi, respectivamente, de 29 e 65. Outro aspecto importante relaciona-se com o facto da avaliação histológica efectuada se basear exclusivamente na ampliação de 10x e não ser feita qualquer referência ao número de cortes seriados estudados por amostra. Em contrapartida, a avaliação histológica por nós realizada recorreu sistematicamente às ampliações de 20X e 50X, frequentemente necessárias para caracterizar a intensidade e aferir a extensão do processo inflamatório. Além disso, foram realizados cerca de 100 cortes seriados por amostra e desses corados 10 com hematoxilina/eosina (HE), 1 com Van Giemsa e outro com a técnica de Brown e Brenn. Destes, foram avaliados 5 cortes centrais, separados aproximadamente 100  $\mu$ m entre si, corados com HE, sendo atribuído a cada canal o nível mais desfavorável observado na série para os parâmetros histopatológicos em estudo. Salientamos que a inflamação de intensidade ligeira foi observada em zonas muito localizadas, geralmente junto a comunicações dos *foramina* com o tecido periapical, pelo que apenas a observação cuidada de cortes seriados permitiu que a sua presença não tenha sido subestimada. O estudo de Shipper e colaboradores também é omissos em relação à idade dos animais, factor que consideramos de relevo, na medida em que esta influencia a área de comunicação entre o espaço pulpar e o ligamento periodontal, interferindo por isso com a possível agressão dos materiais ou microrganismos aos tecidos periapicais.

Por outro lado, um estudo recente comparou o nível de inflamação periapical apresentado por dentes obturados com Resilon™/Epiphany™, restaurados de imediato ou deixados expostos à saliva durante 3 meses, constatando-se o desenvolvimento de inflamação grave em dentes obturados com este material e subsequentemente expostos à microinfiltração coronária (Leonardo *et al.* 2007). Os resultados indicam uma incidência de inflamação grave mais elevada nos canais expostos do que nos restaurados, sendo a diferença encontrada estatisticamente significativa. No entanto, o material de obturação alternativo estudado, uma combinação de guta-percha com o cimento endodôntico Sealapex®, apresentou um desempenho pior, quer no que respeita à biocompatibilidade quer em relação à resistência à microinfiltração. Destacamos ainda uma particularidade deste estudo, a permeabilização do ápice alcançada com a perfuração do cimento, por forma a promover uma área de contacto padronizada entre os materiais e os tecidos periapicais. Por si só esta manobra pode ser responsável por uma parte significativa da resposta inflamatória observada. Porém, todos

os canais foram tratados de acordo com o mesmo protocolo e o desempenho apresentado por ambos os grupos evidenciou diferenças estatisticamente significativas, pelo que assumimos que o modelo experimental permitiu realizar uma comparação adequada entre os materiais. Os melhores resultados foram observados para os dentes obturados com Resilon™/Epiphany™ e restaurados. A combinação guta-percha/Sealapex® com restauração coronária apresentou resultados similares ao Resilon™/Epiphany™ deixado exposto ao meio oral. Por último, a associação guta-percha/Sealapex® deixada exposta apresentou os níveis mais elevados de intensidade e de extensão da reacção inflamatória.

Por isso, os resultados da nossa investigação situam-se num nível intermédio aos dois anteriores, porquanto observámos inflamação grave no grupo teste e não no grupo controlo negativo, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. A interpretação que fazemos é de que a exposição coronária tem, de facto, um impacto negativo no prognóstico, mas sem a dimensão atribuída por outros estudos publicados (Ray e Trope 1995; Friedman *et al.* 1997; Siqueira *et al.* 2000; Hommez *et al.* 2002; Leonardo *et al.* 2007), aproximando-nos por isso mais da corrente que defende que a obturação canalar, realizada com elevado padrão de qualidade, tem capacidade de resistir à microinfiltração coronária por longos períodos (Ricucci *et al.* 2000; Ricucci e Bergenholtz 2003). Esta convicção ganhou consistência após a realização de um estudo caso-controlo, retrospectivo, visando avaliar a relação entre a integridade da restauração coronária e a presença de periodontite apical, em dentes com tratamento endodôntico realizado há vários anos. A razão dos produtos cruzados, ou seja, a possibilidade relativa de um canal exposto à saliva apresentar uma lesão periapical foi igual a 3. Este indicador constitui uma boa estimativa do risco relativo, e quando o seu valor é superior à unidade significa que estamos perante uma associação positiva entre as variáveis. Contudo, para julgar até que ponto este valor corresponde à verdade, ou melhor, em que medida pode estar influenciado pelo factor acaso, não basta efectuar os cálculos de probabilidade, temos necessariamente de calcular o intervalo de confiança. Para um intervalo de confiança de 95% os valores encontrados foram de 0,75-26,02, incorporando por isso a cifra 1 no intervalo, o que constitui um factor suficiente para não considerar a associação estatisticamente significativa, pelo menos, para esta amostra e nas condições deste estudo (Ricucci *et al.* 2000). De salientar que todos os canais expostos à saliva permaneceram nesse estado por um período mínimo de meses, nalguns casos até mesmo anos, até serem avaliados, o que reforça a persuasão de que a obturação canalar pode resistir por um longo período à microinfiltração co-

ronária. Contudo, voltamos a referir que a inexistência de radiotransparência periapical não exclui a possibilidade de reacção inflamatória a nível histológico (Brynolf 1967; Green *et al.* 1997) nem a possibilidade de entrada de microrganismos no sistema canalar (Molander *et al.* 1998; Zoletti *et al.* 2006) capazes de encontrarem no futuro condições propícias ao seu crescimento e promoverem o desenvolvimento de patologia apical. Pelo que acabámos de dizer, clinicamente defendemos que a presença de sinais de degradação da restauração coronária, com comprometimento da sua capacidade de prevenir a infiltração, constitui uma indicação para a sua substituição com a maior brevidade possível. Em relação à necessidade de retratamento endodôntico após exposição da obturação canalar ao meio oral, não existem neste momento provas científicas suficientes para definir directivas, que terão sempre de ter em linha de conta a natureza do material de obturação e a qualidade técnica da mesma, bem como a extensão da sua contaminação. Acreditamos que num futuro próximo venham a ser melhorados testes já desenvolvidos para avaliar a presença de microrganismos específicos (Kishen *et al.* 2004) e descobertos novos exames capazes de determinar, no decurso da consulta, a quantidade de microrganismos ainda presentes no interior do canal.

De acordo com o estabelecido pela especificação ANSI/ADA número 57 (ANSI/ADA 2000), a solubilidade de um cimento endodôntico após sofrer reacção de presa ou polimerização não deve exceder os 3% da sua massa, tendo sido determinado o valor de 3,41% para o Epiphany™ (Versiani *et al.* 2006). Associando a este aspecto a susceptibilidade apresentada pelo polímero de policaprolactona, principal constituinte do Resilon™, à hidrólise alcalina (Tay *et al.* 2005) e enzimática (Hiraishi *et al.* 2007), constatamos que as propriedades físico-químicas apresentadas *in vitro* não auguram um bom desempenho em condições clínicas de exposição prolongada aos fluidos orais. Outro aspecto desfavorável prende-se com as dificuldades encontradas para o desenvolvimento de uma zona híbrida previsível que foram evidenciadas em estudos de ultraestrutura com imagens a revelarem falhas ao nível da interface cimento endodôntico/parede de dentina (Tay *et al.* 2005). Estas podem ser facilmente compreensíveis se pensarmos nos obstáculos inerentes à aplicação uniforme do Epiphany™ primer nas paredes do canal, em toda a sua extensão, desde a zona apical até à coronária, por meio de uma ponta de papel. Perante a dificuldade de execução técnica deste passo do protocolo, não surpreendem os maiores valores de adesão alcançados em superfícies de dentina radicular planas face à adesão conseguida no interior dos canais (Bouillaguet *et al.* 2003). Outro facto que dificulta a adesão, no interior



do canal radicular, é a amplificação da contracção de polimerização promovida pelo designado factor de configuração, ou seja, o quociente entre o número de faces cavitárias aderidas e livres. Quanto mais elevado é este factor maior a tensão da contracção de polimerização sobre a interface com o substrato aderido, reconhecendo-se que configurações cavitárias com factor C acima de 3 apresentam um elevado risco de sofrer descolamento e microinfiltração (Yoshikawa *et al.* 1999). Enquanto que a restauração de uma cavidade de uma lesão cariosa de classe V de Black apresenta uma relação de 1:1, uma cavidade de acesso pode variar de 6 a 10:1, e num canal radicular obturado com polímeros de resina o factor C pode mesmo chegar até 100:1 (Carvalho *et al.* 1996). Uma das soluções encontradas para este problema, na área da Dentistaria Operatória, consiste na realização de polimerização por incrementos. Contudo, esta solução prevê-se de difícil aplicação em Endodoncia, sobretudo devido à consequente morosidade do processo. Outra estratégia consiste em retardar a velocidade da reacção de autopolimerização, permitindo alguma libertação de tensão durante o endurecimento. Porém, neste momento o tempo necessário é já de 30 minutos e o seu aumento vem acompanhado de um risco acrescido de contaminação da interface por humidade, o que pode prejudicar a taxa de conversão dos monómeros. Dois caminhos que podem eventualmente ser explorados são a utilização de um solvente mais volátil na composição do “primer”, de modo a facilitar a remoção de excessos, e a diminuição da viscosidade do cimento endodôntico, por forma a facilitar a aplicação de uma camada mais fina e uniforme sobre a parede do canal.

A explicação da inflamação ligeira por nós observada permanece no campo da especulação. Teoricamente, podemos estar perante 3 situações: a) a persistência de resposta tecidular aos procedimentos de preparação biomecânica; b) a permanência da resposta à medicação intracanal ou aos materiais de obturação, ou c) um estágio inicial de desenvolvimento de periodontite apical (Mah *et al.* 2003). No primeiro estudo publicado com este modelo experimental, com 14 semanas de seguimento após a inoculação, a inflamação ligeira foi considerada como uma reacção aos procedimentos operatórios (Friedman *et al.* 1997). No segundo estudo, com 6 meses de acompanhamento, a presença de inflamação ligeira foi bastante mais reduzida, passando dos 67% observados às 14 semanas para os 25%, sendo a relação entre a inflamação ligeira e a grave observada nos 2 grupos avaliados muito semelhante. Esta associação persuadiu os autores a interpretar ambas as reacções como representando fases diferentes da mesma entidade, sendo por isso a inflamação ligeira considerada como um

factor adverso (Friedman *et al.* 2000). Contudo, a perda de restaurações coronárias no referido estudo foi bastante significativa, o que comprometeu o valor comparativo do controlo negativo para aferir a resposta em canais não expostos à microinfiltração coronária, condicionando por isso o valor das conclusões que se poderiam inferir a partir dos resultados observados no grupo teste. No último estudo publicado pelo grupo, a inflamação ligeira afectou 28% das raízes no grupo teste e 30% no grupo controlo negativo (Mah *et al.* 2003). No nosso trabalho, os valores encontrados foram respectivamente de 35% e 31%, com todos os controlos negativos validados. Perante esta sequência de resultados inferimos que a inflamação ligeira observada é fundamentalmente o resultado dos procedimentos operatórios utilizados e não da agressão causada, directa ou indirectamente, pela entrada de microrganismos no sistema canalar. De qualquer modo, quer o aparecimento de periodontite apical quer a diminuição da resposta à toxicidade inerente aos materiais são processos com uma evolução temporal, pelo que o esclarecimento da sua dinâmica passaria pela avaliação dos tecidos ao fim de diferentes períodos de observação, após a obturação e a inoculação coronária de microrganismos.

Entre os eventos envolvidos na inflamação destacamos dois mecanismos, descritos na literatura, que se encontram em consonância com as observações por nós efectuadas. Ao nível dos tecidos periapicais existem fibras nervosas sensitivas e do sistema nervoso simpático (Toriya *et al.* 1997; Kabashima *et al.* 2002) que são estimuladas pelos mediadores inflamatórios e que podem desenvolver-se por um processo denominado “nerve sprouting” (Kimberly e Byers 1988; Haug e Heyeraas 2003). Esta proliferação de tecido nervoso foi histologicamente perceptível, embora não tenhamos realizado uma análise quantitativa do fenómeno. Existem, de facto, provas científicas de que o sistema neuronal se encontra intimamente ligado à expansão ou estabilização das lesões periapicais, o que sugere que as interações neuroimunitárias têm um papel de destaque na modulação das lesões periapicais. Estes mediadores estabelecem uma cadeia em que os mesmos, ou a sua síntese, são activados ou suprimidos por outros, sendo cada um deles apenas um componente do sistema e a progressão ou estabilização das lesões determinada pelo estado final da cadeia (Sasaki *et al.* 2004). Outra face do mesmo problema é a designada inflamação neurogénica. Esta resulta da activação de neurónios periféricos com a consequente libertação de neuropeptídeos com efeito vasodilatador e de aumento da permeabilidade vascular que, consequentemente, auxiliam na iniciação da reacção pró-inflamatória e imune no local da lesão (Olgart 1992). A agressão de fibras C, não mielinizadas, estimula

a libertação de neuropeptídeos como o “Calcitonin Gene Related Peptide” (CGRP) ou a substância P (SP), com a consequente libertação de bradicinina a partir do quinínogeno e de histamina pelos mastócitos, que conduzem à sobre-regulação da permeabilidade vascular (Kawashima 2008). Além disso, os neuromediadores libertados podem actuar directamente no tecido alvo estimulando a quimiotaxia leucocitária, regulando a libertação de mediadores inflamatórios com origem nos macrófagos e linfócitos, assim como facilitando a proliferação de fibroblastos (Saito *et al.* 1991; Toriya *et al.* 1997).

Devemos ter sempre presente que a inflamação é um processo fundamental, que permite aos tecidos ultrapassar as agressões e iniciar os processos de reparação ou regeneração, nos quais estão envolvidos diversos mecanismos.

A análise histomorfométrica permitiu constatar um aumento estatisticamente significativo da área de cemento secundário formada nos dentes tratados em duas sessões. Este aumento poderia ser o resultado da medicação com o gel de clorhexidina ou apenas uma associação fortuita. A constatação do facto de o grupo 2 apresentar uma incidência de inflamação superior ao grupo 1, incentivou-nos a estudar estatisticamente a associação entre a variável inflamação e a formação de cemento secundário. A análise revelou uma correlação positiva entre a presença de inflamação ligeira e o aumento da área de cemento secundário. De tal modo que julgamos que o aumento da deposição de cemento secundário faz parte integrante da resposta à agressão e actua no sentido de atingir o ideal histológico classicamente traçado para o tratamento endodôntico, ou seja, o encerramento biológico do ápice radicular com tecido mineralizado. Outro aspecto que salientamos é a concordância entre os dados quantitativos da análise histomorfométrica da espessura do ligamento periodontal e a avaliação qualitativa do nível de inflamação periapical presente nas amostras. Estas variáveis apresentaram entre si uma correlação directa.

Comparando globalmente o grupo 1 com o grupo 2 verificamos que o nível de inflamação observado nas raízes tratadas numa única sessão é inferior ao das medicadas com gel de CHX, sendo a diferença existente estatisticamente significativa, ou seja, rejeitamos a hipótese nula do estudo. Existem diversas explicações possíveis para estes resultados. Sem querer estabelecer uma ordem de probabilidade entre elas, a primeira que sugerimos é que a inflamação seja uma expressão da toxicidade inerente ao próprio gel de CHX já descrita em estudos anteriores, realizados *in vitro* com culturas celulares, nos quais a intensidade da reacção observada esteve relacionada com o tempo de exposição e o

veículo utilizado (Babich *et al.* 1995), ou ainda, um efeito de redução da síntese de colagénio cuja intensidade foi dependente da dose (Mariotti e Rumpf 1999). A segunda prende-se com a maior probabilidade de ocorrer uma inadvertida quebra da cadeia asséptica ao realizarmos o tratamento em duas sessões. Embora não existam estudos a avaliar objectivamente esta questão, é sabido que o aumento do número de sessões facilita a contaminação accidental dos canais, quer devido a falhas inerentes ao comportamento do clínico e do pessoal auxiliar (Bergenholtz e Spangberg 2004), quer pela possibilidade de exposição do espaço pulpar à infiltração coronária no período que decorre entre consultas (Siren *et al.* 1997). A permanência de resíduos do gel de clorhexidina na parede do canal radicular, capazes de interferirem com a correcta hibridização da dentina e adesão do material de obturação, também deve ser questionada. Contudo, o efeito do condicionamento da dentina com CHX na adesão do Epiphany™ ainda não está publicado, existindo apenas dados científicos obtidos de estudos com adesivos dentinários que não mostram diminuição da adesão após desinfecção da dentina canalar com CHX (Erdemir *et al.* 2004). Além disso, o estudo de microinfiltração coronária por nós realizado *in vitro* não evidenciou qualquer prejuízo da ligação do material à dentina exposta ao gel. Por último, é reconhecido que a obturação na mesma sessão da preparação biomecânica beneficia de um conhecimento mais detalhado da morfologia canalar e por isso pode proporcionar uma melhoria os resultados técnicos obtidos. A maior incidência de casos de extravasamento de cimento endodôntico que observámos nos casos tratados em duas sessões encontra-se em consonância com esta convicção. Contudo, radiograficamente não encontramos sinais relacionados com o limite apical ou a densidade da obturação que evidenciem diferenças entre ambas as modalidades, se bem que tenhamos presente o valor limitado da radiologia convencional no que concerne à avaliação da qualidade da obturação (Kersten *et al.* 1987), pelo que não extraimos dela informações conclusivas.

A utilização do gel de clorhexidina a 2%, durante uma semana, antes da obturação com o sistema Epiphany™/Resilon™, não conferiu, neste modelo experimental, a esperada protecção contra o desenvolvimento de inflamação periapical, apesar de ter mostrado *in vitro* capacidade para melhorar a resistência à microinfiltração coronária de bactérias e fungos, compatível com o perfil de substantividade antimicrobiana demonstrado em estudos anteriores (Komorowski *et al.* 2000; Lenet *et al.* 2000; Basrani *et al.* 2002; Rosenthal *et al.* 2004). Para além das razões anteriormente apontadas, este facto pode dever-se a diferenças entre a situação *in vitro* e *in vivo*, dado que neste último modelo perdemos o

controlo sobre algumas das variáveis, para além de termos a considerar aspectos clínicos particulares.

De facto, na clínica, nas horas que sucedem à realização de uma biopulpectomia, é expectável a formação de algum transudato periapical, em consequência da ruptura de vasos que ocorre ao nível do ápice. A albumina sérica, uma proteína presente no mesmo, demonstrou capacidade para inibir de forma intensa o poder antimicrobiano da clorohexidina (Portenier *et al.* 2006). A utilização de irrigação final com uma solução quelante como o EDTA, eficaz na remoção da parte inorgânica da dentina e que, por isso, expõe a malha de colagénio, também pode contribuir para uma diminuição da acção antimicrobiana da CHX (Portenier *et al.* 2002; Haapasalo *et al.* 2007). Contudo, a utilização de irrigação final com EDTA por nós realizada também foi efectuada no estudo de Rosenthal e colaboradores, antes da irrigação com CHX a 2% durante 10 minutos, e ainda assim estes autores demonstraram a presença de actividade antimicrobiana residual até às 12 semanas (Rosenthal *et al.* 2004), pelo que o verdadeiro impacto do tratamento prévio com EDTA na redução da eficácia antimicrobiana da CHX necessita ainda de ser aprofundado.

Ainda constitui uma incógnita o período de tempo durante o qual se mantém o nível de eficácia clínica da substantividade antimicrobiana da dentina exposta à CHX. Os estudos prévios demonstraram que os efeitos podem estar presentes até aos 21 dias (Komorowski *et al.* 2000; Basrani *et al.* 2002), aos 80, no nosso estudo *in vitro*, ou mesmo 12 semanas (Rosenthal *et al.* 2004). Por outro lado, este estudo *in vivo* prolongou-se por 7 meses, o que pode estar para além do período de protecção conferido pela substantividade induzida pela CHX na dentina dentina. Outro factor a considerar é o fluxo salivar que ocorreu durante a semana em que o grupo teste esteve exposto. No cão pode-se esperar um fluxo salivar de 0,5 ml/minuto (Misawa *et al.* 1985), o que pode criar um gradiente de concentração favorável à difusão passiva da clorohexidina a partir da parede do canal para a cavidade oral. Nos humanos, o volume de saliva secretada é ainda maior, variando o fluxo de saliva total em repouso entre os 0,2-0,7 g/minuto e o estimulado pode mesmo chegar a 1-3,1 g/minuto, o que pode aumentar a magnitude do fenómeno (Mata 2003).

A falta de correlação entre o ensaio de microinfiltração coronária *in vitro* e o modelo experimental animal são, de resto, corroboradas por estudos anteriores onde não se encontrou paralelismo entre os dois modelos (Pitt Ford 1983; Madison *et al.* 1987; Swanson e Madison 1987; Madison e Wilcox 1988).

A percentagem de casos em que observámos extravasamento de cimento endodôntico foi de 13%, o que está em conformidade com outros estudos experimental (Holland *et al.* 2003), assim como clínico, quando a obturação do canal radicular foi realizada com técnicas termoplásticas de compactação vertical (Hoskinson *et al.* 2002). O cimento endodôntico Epiphany™ extravasado para os tecidos periapicais evocou em seu redor uma reacção inflamatória ligeira a moderada, sempre com formação de uma cápsula fibrosa organizada, associada a infiltrado de linfócitos ou plasmócitos e, nos casos de maior intensidade, com macrófagos e células gigantes multinucleadas associadas a zonas de proliferação de neovasos e hiperémia. Na composição química do cimento endodôntico Epiphany™ encontra-se uma mistura de resinas, entre elas monómeros de uretanodimetacrilato (UDMA), polietilenoglicoldimetacrilato (PEGDMA), bisfenoldimetacrilato etoxilato EBDMA e bisfenoldiglicidilmetacrilato (BisGMA), com um perfil de toxicidade significativo (Yoshii 1997; Van Landuyt *et al.* 2007). Também não podemos excluir um contributo da toxicidade dos componentes do Epiphany™ primer, nomeadamente o hidroxietilmetacrilato (HEMA) (Geurtsen *et al.* 1999; Bouillaguet *et al.* 2006; Merdad *et al.* 2007), na reacção observada.

Num estudo comparativo entre a citotoxicidade do sistema Epiphany™/Resilon™, RoekoSeal/guta-percha e Sealite®/guta-percha, realizado *in vitro*, com culturas celulares de fibroblastos L929, não foram encontradas diferenças significativas entre os materiais. Contudo, quando os autores estudaram os mesmos materiais com testes realizados em conformidade com a normativa ISO 10993-5, o cimento endodôntico Epiphany™ avaliado isoladamente despoletou o maior índice de toxicidade inicial entre os materiais em estudo, diminuindo após 2 dias para níveis semelhantes aos restantes (Susini *et al.* 2006). Key e colaboradores estudaram a biocompatibilidade dos componentes do sistema Epiphany™/Resilon™ em culturas de fibroblastos humanos, concluindo que o Resilon™ apresenta um nível de biocompatibilidade comparável à gutapercha e a toxicidade do Epiphany™ é sobreponível à dos cimentos de Grossman®, Thermaseal® e Sealapex™. O facto mais surpreendente deste estudo foi o efeito observado com o Epiphany™ primer, cujo o resultado se traduziu pela fixação das células, impedindo a comparação com os outros grupos testados, manifestando antes um comportamento bastante similar ao observado no controlo negativo, no qual se utilizou o formaldeído, um conhecido fixador celular (Key *et al.* 2006). O HEMA contido no Epiphany™ primer é o principal indiciado pela fixação observada, pois existem provas de que, por si só, consegue reduzir a actividade da desidrogenase succínica em aproximadamente 90% (Bouillaguet *et al.* 2006) e



impedir a progressão do ciclo celular (Chang *et al.* 2005), o que torna a falta de controlo sobre a possibilidade de exposição inadvertida dos tecidos periapicais a este líquido uma fonte de forte preocupação durante a sua aplicação clínica.

A compactação vertical da massa de material de obturação plastificada em direcção apical poderá arrastar uma mistura de resíduos do Epiphany™ primer não absorvidos, associadas ao cimento endodôntico propriamente dito, que são introduzidos nos tecidos periapicais num estado não polimerizado. Nesta localização torna-se impraticável a chegada de luz do fotopolimerizador e a consequente activação dos fotoiniciadores, pelo que todo o processo fica dependente exclusivamente da autopolimerização do material, que apresenta sempre uma taxa de conversão de monómeros em polímeros inferior ao modo de dupla polimerização (auto e fotopolimerização) (Peutzfeldt 1997). Daqui se infere que nestas condições ocorre uma maior libertação de monómeros livres e estes podem exercer a sua toxicidade com maior intensidade sobre as células do hospedeiro (Geurtsen *et al.* 1999; Kaga *et al.* 2001). Estes monómeros de resina apresentam vários efeitos deletérios nas células eucarióticas, estando estabelecido que são citotóxicos em concentrações desde os 0,3 aos 88 mmol/litro, consoante a estrutura do monómero (Yoshii 1997), assim como podem causar imunossupressão dos linfócitos T (Jontell *et al.* 1995) e activação do sistema do complemento (Payne e Horbett 1987), em concentrações sub-citotóxicas, desempenhando por isso um papel importante na resposta imunoinflamatória. A gravidade da reacção tecidular que observámos foi proporcional à quantidade de cimento extravasado, o que julgamos estar relacionado com o facto de um maior volume de material libertar uma quantidade superior de monómeros e manter a agressão por um período mais longo.

Os macrófagos constituem as principais células diferenciadas do sistema fagocítico mononuclear. Têm a sua origem nos monócitos que passam para o tecido extravascular e se transformam em macrófagos tecidulares. São células com um movimento lento e uma semi-vida longa, capazes de permanecer na zona da inflamação ao longo de vários meses. A sua movimentação é direccionada pelo gradiente de factores quimiotácticos, podendo ser activados por mediadores celulares, químicos ou partículas estranhas, tornando-se nesse estado maiores e evidenciando numerosos grânulos citoplasmáticos. Observámos regularmente macrófagos activados nas proximidades do material extravasado, com um aspecto morfológico compatível com a fagocitose activa de partículas do cimento endodôntico Epiphany™. Nos casos de reacção moderada, foi possível visualizar

a sua fusão e o aparecimento de células gigantes multinucleadas dispostas sobre a superfície externa da massa de material extravasado.

Os resultados da presente investigação podem ser complementados pela avaliação da eficácia da CHX no tratamento de dentes com periodontite apical, comparando a abordagem numa única ou em duas sessões, com a utilização de hidróxido de cálcio como medicação intracanal de referência. A realização de um ensaio clínico com controlo microbiológico realizado por técnicas de biologia molecular, por forma a ultrapassar as limitações das técnicas clássicas de cultura de microrganismos, e cujo controlo da cicatrização/regeneração apical não dependa das técnicas de radiologia convencional, seria um passo importante no esclarecimento da relevância clínica da CHX. Nesse sentido, estão hoje em desenvolvimento técnicas imagiológicas com um maior poder discriminativo, que permitem acompanhar a dinâmica de cicatrização das lesões periapicais com maior rigor e de forma mais objectiva. Entre elas destacamos a tomografia computadorizada de feixe cónico (Estrela *et al.* 2008) e a tomografia computadorizada com multidetectores (Nakata *et al.* 2006), capazes de diagnosticar lesões apicais cujo desenvolvimento ainda se encontra limitado ao osso esponjoso. Estas técnicas permitirão, num futuro próximo, aumentar a capacidade de avaliarmos o prognóstico de diferentes modalidades de tratamento de forma quantitativa, detalhada e não invasiva.

## C) Conclusões

De acordo com a metodologia utilizada no modelo experimental *in vitro* e os resultados encontrados pode concluir-se que:

- 1 – A medicação intracanal com gel de clorhexidina a 2%, durante uma semana, conferiu uma resistência adicional à microinfiltração coronária de *Candida albicans* ( $p=0,0396$ ), todavia o mesmo não se verificou para o *Enterococcus faecalis* ( $p=0,3554$ ).
- 2 – A obturação canal com Epiphany™/Resilon™ ou guta-percha/GuttaFlow®, apresentou uma resistência superior à microinfiltração coronária do que o método clássico de compactação lateral de guta-percha associada ao cimento endodôntico Pulp Canal Sealer®.
- 3 – Os diferentes perfis de contaminação apresentados pelas amostras submetidas à infiltração de bactérias ou de fungos sugerem que o modelo experimental tem impacto nos resultados obtidos. Não obstante, manteve-se o perfil geral de resistência de todos os grupos estudados frente a ambos os microrganismos.
- 4 – A manutenção dos controlos negativos sem contaminação ao longo de todo o período de estudo valida a metodologia do modelo experimental de inoculação coronária de microrganismos.

Relativamente à metodologia e aos resultados obtidos com o modelo experimental *in vivo*, podemos concluir que:

- 1 – O estudo rejeita a hipótese nula, ou seja, a medicação intracanal com gel de clorhexidina a 2% não conferiu, neste modelo experimental, uma protecção adicional contra o desenvolvimento de inflamação periapical em raízes obturadas expostas à microinfiltração coronária. De facto, canais sem medicação e obturados numa única sessão apresentaram uma menor incidência de inflamação periapical.
- 2 – Independentemente da abordagem terapêutica, em sessão única ou com medicação intracanal, a realização de biopulpectomia e obturação canal com o sistema Resilon™/Epiphany™, numa sessão única ou com medicação intracanal durante 1 semana, permite um prognóstico histológico favorável, traduzido pela ausência de inflamação periapical em 66% dos casos tratados.
- 3 – A obturação canal com Resilon™/Epiphany™ não impediu o desenvolvimento de inflamação grave, verificada em 8% das raízes expostas ao meio oral, sugerindo que este material pode ser permeável ao ingresso de microrganismos.
- 4 – A histomorfometria permitiu a introdução de parâmetros de avaliação quantitativa úteis na análise da reacção inflamatória periapical. O aumento da intensidade da inflamação foi directamente proporcional à espessura do ligamento periodontal e à área de cimento secundário. Nos grupos tratados com gel de clorhexidina a 2% ambas as variáveis apresentaram um aumento estatisticamente significativo.
- 5 – A extrusão periapical de cimento endodôntico Epiphany™ intensificou a resposta inflamatória periapical.
- 6 – A radiologia convencional não permitiu diagnosticar a presença de inflamação periapical, mesmo de intensidade grave, excepto quando associada a padrões de reabsorção radicular que envolveram não só o cimento mas também a dentina.
- 7 – A exposição dos canais radiculares não obturados à flora oral induziu, invariavelmente, o desenvolvimento de inflamação periapical de intensidade

grave, a qual persiste decorridos 6 meses após a inoculação, associada à existência de reabsorção do cimento e da dentina.

No enquadramento dos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* utilizados não se verificou uma correlação nos resultados obtidos em ambos os estudos. Concretamente, o modelo *in vivo* não permitiu confirmar a protecção adicional contra a microinfiltração coronária conferida pela medicação intracanal, com gel de clorhexidina a 2%, verificada no modelo *in vitro*. Este estudo vai de encontro à ideia defendida pelos autores que questionam a validade clínica dos resultados obtidos nos modelos de microinfiltração *in vitro*.





### **III – Resumo**

---



## Resumo

O principal factor etiológico para o desenvolvimento de patologia periapical é a infecção intrarradicular por microrganismos da flora oral. Por isso, o tratamento endodôntico tem como objectivo preservar as condições de assépsia ou eliminar os microrganismos do interior dos canais radiculares, tendo em vista promover a manutenção ou o restabelecimento da integridade dos tecidos periapicais.

As condições de assépsia, alcançadas durante a fase de preparação biomecânica, devem ser preservadas com a realização da obturação tridimensional do sistema canalar, seguida da restauração coronária. Com este procedimento, o clínico pretende impedir a entrada ou reentrada dos microrganismos no sistema canalar e a sua posterior progressão até aos tecidos periapicais.

No entanto, a longo prazo, mesmo que todas as etapas terapêuticas anteriormente referidas sejam meticulosamente executadas, os microrganismos podem invadir o canal a partir da cavidade de acesso, dos canais laterais ou dos túbulos dentinários. A microinfiltração coronária resultante da recidiva de cárie, de fractura ou degradação da interface dente/material de restauração, desempenha um papel primordial neste processo. A partir do momento em que os microrganismos chegam ao sistema de canais radiculares podem encontrar condições propícias à sua progressão ao longo da obturação canalar e interagir com os tecidos periapicais. A sua interacção directa ou indirecta através da libertação de toxinas facilitam o desenvolvimento de patologia periapical pós-tratamento, ou seja, influenciam negativamente o prognóstico do tratamento endodôntico.

De um modo genérico podemos afirmar que, utilizando os critérios de Strindberg, as terapêuticas actualmente disponíveis permitem taxas de sucesso, após 4 a 6 anos, de cerca de 95% para situações de biopulpectomia, e de aproximadamente 80% para dentes com periodontite apical.

Por conseguinte, o desenvolvimento de materiais e métodos terapêuticos que permitam impedir a propagação dos microrganismos constitui um desígnio para a optimização do prognóstico do tratamento.

A clorhexidina é um agente antimicrobiano, de largo espectro, efectivo contra a maioria dos microrganismos envolvidos no desenvolvimento da periodontite apical. Reveste-se de particular interesse devido à sua capacidade de eliminar o *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans*, espécies resistentes aos clássicos medicamentos de uso intracanal e frequentemente associadas aos casos de insucesso do tratamento endodôntico. A sua adsorção à dentina e a posterior libertação gradual, ao longo de várias semanas, em concentrações com eficácia antimicrobiana, conferem-lhe a designada substantividade antimicrobiana. Esta propriedade pode possibilitar uma resistência adicional da obturação canal à microinfiltração coronária, quer pela existência de um mecanismo farmacológico capaz de compensar falhas adesivas ou coesivas no material de obturação, quer pela melhoria do substrato para a adesão resultante do condicionamento da dentina.

O objectivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro* e *in vivo*, a eficácia de um gel de clorhexidina a 2%, aplicado como medicação intracanal por um período de 7 dias, na prevenção da microinfiltração coronária após a obturação.

No modelo experimental *in vitro* a hipótese foi testada frente a 3 materiais de obturação diferentes: a) um cimento endodôntico extensamente estudado e com alargada utilização clínica, o Pulp Canal Sealer® (Kerr – SybronEndo); b) um cimento endodôntico recentemente introduzido no mercado, o GuttaFlow® (Coltène/Whaladent) e c) um material recém desenvolvido, o Resilon™/Epiphany™ (Pentron Clinical Technologies). Este último material representa um novo paradigma na obturação de canais radiculares, substituindo a utilização de gutta-percha por um polímero à base de policaprolactona (Resilon™), que é utilizado como material de núcleo, associado a um cimento endodôntico (Epiphany™), com o qual tem possibilidade de estabelecer ligação química.

Realizou-se a preparação biomecânica de 140 canais de dentes monoradiculares, com morfologia recta, e comprimento padronizado de 16 milímetros. As raízes foram divididas em 12 grupos teste, de 10 espécimes cada, e 4 grupos controlo, de 5 espécimes cada, sendo depois aleatoriamente atribuídos

aos grupos em estudo. Metade dos grupos teste foram previamente medicados com o gel de clorhexidina a 2%, durante uma semana, e a outra metade imediatamente obturada com cada um dos 3 materiais anteriormente referidos. Posteriormente todas as amostras foram submetidas à inoculação coronária de bactérias (*Enterococcus faecalis*) ou fungos (*Candida albicans*), no modelo experimental de dupla câmara desenvolvido por Torabinejad e colaboradores, durante um período de 80 dias.

De acordo com a metodologia utilizada no modelo experimental *in vitro* e os resultados encontrados pode concluir-se que:

- 1 – A medicação intracanal com gel de clorhexidina a 2%, durante uma semana, conferiu uma resistência adicional à microinfiltração coronária de *Candida albicans* ( $p=0,0396$ ), todavia o mesmo não se verificou para o *Enterococcus faecalis* ( $p=0,3554$ ).
- 2 – A obturação canal com Epiphany™/Resilon™ ou guta-percha/GuttaFlow®, apresentou uma resistência superior à microinfiltração coronária do que o método clássico de compactação lateral de guta-percha associada ao cimento endodôntico Pulp Canal Sealer®.
- 3 – Os diferentes perfis de contaminação apresentados pelas amostras submetidas à infiltração de bactérias ou de fungos sugerem que o modelo experimental tem impacto nos resultados obtidos. Não obstante, manteve-se o perfil geral de resistência de todos os grupos estudados frente a ambos os microrganismos.

No estudo experimental *in vivo* a hipótese foi testada frente a um único material de obturação, tendo sido escolhido o Resilon™/Epiphany™. Esta opção prendeu-se sobretudo com a necessidade de manter o tamanho da amostra dos diferentes grupos dentro do nível exigido pelo planeamento estatístico. Além disso optámos por utilizar o material mais recentemente desenvolvido, por representar uma nova abordagem na área da obturação canal. O modelo permitiu avaliar a biocompatibilidade dos materiais utilizados, bem como a sua eficácia clínica perante a microinfiltração coronária de microrganismos.

Neste estudo foram utilizadas 6 cadelas de raça Beagle, com cerca de dois anos de idade, e o protocolo operatório envolveu a utilização de 10 prémolares birradiculares em cada animal. Os canais em estudo foram alvo de aleatorização

por blocos, tendo em cada cadela sido atribuído um prémolar ao grupo controlo positivo, três aos grupos controlo negativo e seis aos grupos teste. O grupo 1 foi preparado e obturado na mesma sessão com Epiphany™/Resilon™. O grupo 2 foi preparado e medicado com gel de clorhexidina a 2%, durante uma semana, e na segunda sessão obturado com o mesmo material e técnica que o grupo 1.

Relativamente à metodologia e aos resultados obtidos com o modelo experimental *in vivo*, podemos concluir que:

- 1 – O estudo rejeita a hipótese nula, ou seja, a medicação intracanal com gel de clorhexidina a 2% não conferiu, neste modelo experimental, uma protecção adicional contra o desenvolvimento de inflamação periapical em raízes obturadas expostas à microinfiltração coronária. De facto, canais sem medicação e obturados numa única sessão apresentaram uma menor incidência de inflamação periapical.
- 2 – Independentemente da abordagem terapêutica, em sessão única ou com medicação intracanal, a realização de biopulpectomia e obturação canal com o sistema Resilon™/Epiphany™, numa sessão única ou com medicação intracanal durante 1 semana, permite um prognóstico histológico favorável, traduzido pela ausência de inflamação periapical em 66% dos casos tratados.
- 3 – A obturação canal com Resilon™/Epiphany™ não impediu o desenvolvimento de inflamação grave, verificada em 8% das raízes expostas ao meio oral, sugerindo que este material pode ser permeável ao ingresso de microrganismos.
- 4 – A histomorfometria permitiu a introdução de parâmetros de avaliação quantitativa úteis na análise da reacção inflamatória periapical. O aumento da intensidade da inflamação foi directamente proporcional à espessura do ligamento periodontal e à área de cimento secundário. Nos grupos tratados com gel de clorhexidina a 2% ambas as variáveis apresentaram um aumento estatisticamente significativo.
- 5 – A extrusão periapical de cimento endodôntico Epiphany™ intensificou a resposta inflamatória periapical.

No enquadramento dos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* utilizados não se verificou uma correlação entre os resultados obtidos em ambos os estudos.



Concretamente, o modelo *in vivo* não permitiu confirmar a protecção adicional contra a microinfiltração coronária conferida pela medicação intracanal, com gel de clorhexidina a 2%, verificada no modelo *in vitro*. Este estudo reforça os argumentos defendidos pelos autores que questionam a validade clínica dos resultados obtidos nos modelos de microinfiltração *in vitro*.



## **IV – Abstract**

---



## **Abstract**

### **Introduction**

The development and progression of endodontically induced apical periodontitis is caused by invasion of microorganisms into the root canal system. Thus, root canal treatment procedures focus on exclusion of microorganisms from the root canal system, aiming to maintain or reestablish the integrity of the periapical tissues.

The treatment procedure comprises the establishment of an aseptic environment, biomechanical root canal preparation to curtail microorganisms, three-dimensional filling of the root canal system to resist potential microbial ingress, and a coronal restoration to prevent microbial ingress in the long-term. Following this procedure, clinicians aim to obstruct the coronal pathway for microbial reinfection of the root canal system and the consequent disease of the periapical tissues. Nevertheless, even when all of these therapeutic procedures are meticulously applied, in the long term microorganisms can eventually invade the root canal via the coronal access cavity, lateral canals and dentinal tubules. The principal pathway for microbial invasion of root-filled teeth is coronal microleakage, resulting from caries, cracks or deterioration of the coronal restoration. Once the root canal system is invaded, microorganisms can propagate through the filled canal and interact with the host's periapical tissues. This interaction results in the development of post-treatment apical periodontitis, thereby negatively affecting the outcome of endodontic treatment.

It can be generally stated that the conventional root canal treatment procedures support healthy periapical tissues in 95% of teeth undergoing biopulpectomy, and in approximately 80% of teeth with apical periodontitis, when

using Strindberg's criteria for outcome assessment four to five years after root canal treatment. To enhance these outcomes, therapeutic materials and methods must be developed that can inhibit the ingress and proliferation of microorganisms in root-filled canal systems.

Chlorhexidine is a wide spectrum antimicrobial agent effective against most of the oral microorganisms associated with apical periodontitis. Of particular interest is its ability to kill microorganisms such as *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, that may resist the conventional root canal medications and that are frequently associated with persistence of apical periodontitis after treatment. Chlorhexidine is adsorbed by dentine and subsequently slowly released at substantive antimicrobial levels over a period of several weeks, imparting the so-called "antimicrobial substantivity". If antimicrobial substantivity could be imparted in the root canal system, it would provide extra resistance to coronal microleakage.

## **Objective**

The purpose of this study was to evaluate, *in vitro* and *in vivo*, the efficacy of 2% chlorhexidine gel applied for 7 days as an intracanal medicament, in preventing coronal microleakage and development of apical periodontitis after root canal filling.

## ***In vitro* Coronal Microleakage Study**

This study evaluated the ability of intracanal medication with 2% chlorhexidine gel, followed by root filling with 3 different materials, to resist microbial ingress of *E. faecalis* and *C. albicans* over a period of 80 days. The double chamber coronal microleakage experimental model developed by Torabinejad *et al.* in 1990 was used.

## **Material and Methods**

One hundred forty freshly extracted human teeth with straight, single roots, fully developed apices and without root caries, were de-coronized to a standardized length of 16 millimetres. The canals were prepared biomechanically with the Hero 642® system. Apical patency was maintained throughout the preparation procedure with a size 25 K-type file. The roots were randomly divided into 12 test groups of 10 specimens each, and 4 control groups of 5 specimens each. The groups were duplicated to allow independent and simultaneous testing with *E. faecalis* and *C. albicans*. Half of the test groups were



immediately root filled (A, B, and C) and the other half had the root canals medicated with 2% chlorhexidine gel for a week (D, E and F). The test groups were root-filled as follows: Groups A and D, with Gutta-percha and Pulp Canal Sealer®; groups B and E, with Gutta-percha and GuttaFlow®; groups C and F, with Resilon™ and Epiphany™. In group P (positive control), the canals were not filled, while in group N (negative control), the canals were filled with gutta-percha alone with the apices sealed with All-Bond 2®.

Group	n	CHX 2%	Root canal filling	Apical patency
<b>N</b>	5	-	Gutta-percha (GP)	Apex sealed
<b>P</b>	5	-	-	Apex patent
<b>A</b>	10	-	GP+Pulp Canal Sealer®	Apex patent
<b>B</b>	10	-	GP+GuttaFlow®	Apex patent
<b>C</b>	10	-	Resilon™+Epiphany™	Apex patent
<b>D</b>	10	+	GP+Pulp Canal Sealer®	Apex patent
<b>E</b>	10	+	GP+GuttaFlow®	Apex patent
<b>F</b>	10	+	Resilon™+Epiphany™	Apex patent

Teeth were coated with nail polish except for the apical 2 mm, and each tooth was sealed in a 10 ml glass vial, with an 18-gauge needle inserted through the vial cover and bonded into the pulp chamber and canal orifice with All-Bond 2®. After sterilization with ethylene oxide at 30°C temperature, Brain Heart infusion (for inoculation with *E. faecalis*), or Sabouraud Dextrose (for inoculation with *C. albicans*) was injected into each vial. Each inoculum was inserted through the needle into the root canal every 4 days, and the broth monitored daily for turbidity. When turbidity occurred, the broth was cultured and biochemical identification tests (API-Biomerrux) performed to confirm contamination with the inoculated microorganisms.

### Legends to Figures

Figure 15. Sample of the root specimens used in the study, with size standardized to 16 millimetres from the apex.

Figure 16. Chemical structure of methylcellulose.

Table 3. Description and characterization of positive control, negative control and test groups

- Figure 17. Experimental model with an Endo-Eze® tip cemented to the coronal part of the root and suspended in the vial trough the silicon septum.
- Figure 18. Injection of the culture medium in the inferior chamber until 4 apical millimeters of the root tip are submerged.
- Figure 19. Incubation of samples for 48 hours, to confirm sterility conditions before starting the inoculation.
- Figure 20. Coronal inoculation of microorganisms with a hypodermic insulin needle.
- Figure 21. Inspection of samples to detect signs of contamination indicated by turbidity in the culture medium.
- Figure 22. Culture of *E. faecalis* in solid medium to confirm morphological compatibility with the inoculated strain.
- Figure 23. Biochemical identification test API 20 (Biomerrux) to recognize *E. faecalis*.

### Statistical methods

Statistics were performed using SPSS 14.0. The length of time until turbidity occurred was compared among the different groups using Kaplan-Meier survival analysis. Significant differences in Kaplan Meier curves were evaluated using the log-rank test at  $p < 0,05$ .

### Results *In vitro*

As expected, turbidity in the positive control group specimens occurred rapidly and consistently. In contrast, all the negative control group specimens had no turbidity throughout the study period.

Among the test groups inoculated with *E. faecalis*, the better performance in specimens medicated with chlorhexidine gel was not statistically significant ( $p = 0,3554$ ) from the immediately root-filled specimens. Disregarding the medication with chlorhexidine, specimens filled either with Resilon™/Epiphany™ or gutta-percha/GuttaFlow® performed better than those filled with gutta-percha/Pulp Canal Sealer® ( $p = 0,0005$  and  $0 = 0,0270$ , respectively).

Among the test groups inoculated with *C. albicans*, the specimens medicated with chlorhexidine gel had a significantly better performance ( $p = 0,0396$ ) than the immediately root-filled specimens. The differences among the root filling material combinations were not statistically significant.

## Legends to Figures

- Figure 24. On the left side of the image, samples from the positive control with turbidity indicating contamination of the inferior chamber (white arrows).
- Table 4. Treatment of each experimental group and days on which turbidity occurred in *E. faecalis* coronally inoculated samples.
- Graphic 1. Development of contamination in the samples of the different test groups, inoculated with *E. faecalis*, over the experimental period.
- Graphic 2. Number of samples showing contamination with *E. faecalis* at the end of the experimental period.
- Table 5. Treatment of each experimental group and days on which turbidity occurred in *C. albicans* coronally inoculated samples.
- Graphic 3. Development of contamination in the samples of the different test groups, inoculated with *C. albicans*, over the experimental period.
- Graphic 4. Number of samples showing contamination with *C. albicans* at the end of the experimental period.
- Graphic 5. Global comparison between samples medicated with intracanal chlorhexidine gel (EfCHX and CaCHX) or immediately root filled (Ef and Ca) inoculated with *E. faecalis* (Ef and EfCHX) or with *C. albicans* (Ca and CaCHX).

## Conclusions of the *In vitro* Study

Based on the *in vitro* experimental method used and the results obtained it was concluded that:

1 – Intracanal medication with 2% chlorhexidine gel for one week conferred additional resistance to coronal ingress of *C. albicans* ( $p=0.0396$ ), but not to ingress of *E. faecalis* ( $p=0.3554$ ).

2 – Root fillings with the Resilon™/Epiphany™ and with GuttaFlow® better resisted coronal microbial ingress than root fillings with laterally-compacted gutta-percha and Pulp Canal Sealer®.

3 – The different ingress patterns observed with bacterial and fungal inoculation suggested that the experimental model had an impact on the results. Nevertheless, the general resistance pattern to microbial ingress was comparable for both microorganisms.

### ***In vivo* Coronal Microleakage Study**

The purpose of this study was to assess *in vivo* the efficacy of chlorhexidine applied for 7 days as an intracanal medicament, in preventing periapical inflammation subsequent to coronal exposure and inoculation of root-filled teeth. The animal experimental model developed by Friedman *et al.* in 1997 was used.

In this study we tested the hypothesis using only one type of root canal filling, Resilon™ core and Epiphany™ sealer, in order to maximize the sample size for statistical analysis. The most recently developed root filling material was selected in order to investigate this novel approach to root canal filling. In addition to testing the clinical efficacy of Resilon™/Epiphany™ in preventing coronal microbial ingress and consequent periapical inflammation, this model also allowed the evaluation of the materials' tissue compatibility.

### **Material and Methods**

Canals in the six two-rooted mandibular premolars of six Beagle dogs were prepared with Hero 642® (MicroMega) and assigned to the experimental group. One canal in each tooth was immediately filled with Root Canal Sealant Epiphany™ and Resilon™ core material (Pentron Clinical Technologies), and the access sealed with Photac™ Fil. In the other canal, 2% chlorhexidine gel was placed with a Lentulo spiral, and the access sealed with Photac™ Fil. One week later, the medicated canals were reaccessed, chlorhexidine gel rinsed out and root canals filled as in the one-step group. After three weeks, the pulp chambers of the teeth were exposed and left open to the oral environment for one week, subsequently inoculated with isologous plaque and resealed with Photac™ Fil.

Group	Number of roots (n)	Treatment protocol	Exposure and inoculation
Positive control	12	Root canal preparation without filling	Yes
Negative control	18	Group 1 – one session Resilon™/Epiphany™	No
	18	Group 2 – Chlorhexidine+ Resilon™/Epiphany™	
Test group	36	Group 1 – one session Resilon™/Epiphany™	Yes
	36	Group 2 – Chlorhexidine+ Resilon™/Epiphany™	

Additionally, three two-rooted maxillary premolars in each dog were treated in the same way as the teeth in the experimental group, but the pulp chambers were left sealed to serve as a negative control. A fourth maxillary premolar in each dog was prepared but not root-filled, and exposed to the oral environment to serve as a positive control.

Periapical radiographs were taken before and after treatment, and post-operative controls were done at four and seven months. At seven months, dogs were sacrificed, jaw and maxillary blocks removed, decalcified in Morse's solution (equal parts of 50% formic acid and 20% sodium citrate) and processed for histological evaluation. Serial sections (6 microns thick) were done along the sagittal plane, in a mesio-distal orientation including the entire root canal system and periradicular tissues. Two out of every ten sections were mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin. Moreover, for each root one slide was stained with Van Giemsa and another with Brown and Brenn. The periradicular tissues were examined under a light microscope and the following histomorphological parameters were evaluated:

Parameters	Scores
Periapical inflammation	(0) None, normal appearance of the root surface and surrounding tissues (1) Mild, localized inflammatory cell infiltrate without bone and root resorption (2) Severe, diffuse infiltrate associated with bone and tooth resorption
Mineralized tissue resorption	(0) Absent (1) Cementum resorption (2) Cementum and dentin resorption
Apical openings sealed with mineralized tissue	(0) Complete sealing (1) Sealing beyhond half of apical area (2) Sealing up to half of apical area
Apical limit of root canal filling	(0) Cemental canal (1) Mild sealer extrusion (2) Extrusion of core filling material
Phagocytic cells	(0) Absent (1) Present
Bacteria	(0) Not found (1) Found
Periodontal ligament thickness	Average of the measurements obtained from 3 predefined points in the apical region of the evaluated slides
Secondary cementum area	Average of the measurements obtained in the defined apical area of the evaluated slides

## Legends to Figures

- Table 6. Identification, age and weight of the animals in the beginning of study.
- Figure 25. Diagram of dog's dentition with identification of teeth treated during the experiment.
- Table 7. Synthesis of the experimental protocol in the positive control, negative control and test groups.
- Figure 26. Flowchart of the experimental protocol.
- Figure 27. Absolute isolation of the tooth with rubber dam.
- Figure 28. Antisepsis of the operative field with 10% iodopovidone solution.
- Figure 29. Coronal access cavity with long mesio-distal axis.
- Figure 30. Removal of the pulp tissue from the cervical part of the root.
- Figure 31. Utilization of Glyde™ File Prep lubricant.
- Figure 32. Root canal preparation with Hero 642® system.
- Figure 33. Apical preparation fine-tuning with manual instruments.
- Figure 34. Final flush with 3 ml of saline.
- Figure 35. Drying the canal with absorbent paper points.
- Figure 36. Biomechanical preparation of both canals finished.
- Figure 37. Protection of the canal to be chlorhexidine medicated using a paper point.
- Figure 38. Epiphany™ primer delivery with paper point.
- Figure 39. Root canal conditioning with Epiphany™ primer for 20 seconds.
- Figure 40. Fit of the Resilon™ master cone.
- Figure 41. Insertion of the Epiphany™ sealer with Lentulo spiral.
- Figure 42. 20 seconds photopolimerization after compaction of the filling material.
- Figure 43. Canal filled with Epiphany™/Resilon™ up-to cementum-enamel junction.
- Figure 44. Restoration of half of the access cavity with Photac™ Fil Quick Aplicap.
- Figure 45. Insertion of the chlorhexidine gel inside the canal with a Lentulo spiral.
- Figure 46. Application of a cotton pellet at the orifice of the root canal entrance.
- Figure 47. Antisepsis of the operative field with iodopovidone solution before beginning of the 2<sup>nd</sup> session.
- Figure 48. Removal of the cotton pellet from the root canal entrance with a barbed broach.



- Figure 49. Irrigation with saline with a Monojet® needle size 27G.
- Figure 50. Root canal prepared for filling.
- Figure 51. Root canal filling with Epiphany™/Resilon™ system.
- Figure 52. Coronal restoration with Photac™ Fil Quick Aplicap.
- Figure 53. Exposure of the positive control tooth to oral microflora and maintenance of the integrity of coronal restoration in the negative control.
- Figure 54. Exposure of the access cavity of test group teeth.
- Figure 55. Coronal restoration of the positive control.
- Figure 56. Coronal restoration of the test group teeth.
- Figure 57. Tissue block sections prepared from the superior maxilla. A) Mesial root of the 2<sup>nd</sup> premolar; B) distal root of the 2<sup>nd</sup> and mesial of the 3<sup>rd</sup>; C) distal root of the 3<sup>rd</sup> premolar.
- Figure 58. Tissue block sections prepared from the mandible. A) 2<sup>nd</sup> premolar and mesial root of the 3<sup>rd</sup>; B) 4<sup>th</sup> premolar and distal root of the 3<sup>rd</sup>.
- Figure 59. Paraffin embedding of samples.
- Table 8. Histological parameters evaluated and scores.
- Table 9. Histological scores of tissue reaction to sealers extruded into the periapical tissues.
- Figure 60. Standardization of the references for histomorphometric measurements. Intersection between a line perpendicular to the root canal axis and the most apical point of the cementum-dentinal junction. Measurement points for determination of periodontal ligament thickness (arrows). Defined area for measurement of secondary cementum deposition with differentiated color.

## Statistical Methods

Statistics were performed using SPSS 14.0. The degree of periapical inflammation was analyzed with the Chi-square test for a level of significance of 95% ( $p < 0,05$ ). Histomorphometric measurements of the periodontal ligament thickness and secondary cementum deposition were studied with analysis of variance (ANOVA) and Student's t- test for a level of significance of 95% ( $p < 0,05$ ).

## Results *In vivo*

The total sample of the study included 120 roots. Of the total of 108 root canal fillings performed, the great majority (95 roots) were within the limit of cemento-dentinal junction and the minority (13 roots) had sealer extrusion into the periapical tissues. The latter are analyzed separately.

Only the 12 positive control roots revealed radiographic evidence of periapical pathology. Histologically, none of the 29 roots in the negative control group had severe inflammation, while 9/29 roots (31%) had mild inflammation. In the experimental group, mild inflammation was observed in 13/32 roots (41%) and severe inflammation in 2/32 roots (6%) medicated with chlorhexidine gel, while in the one-step group mild inflammation was observed in 5/33 roots (15%) and severe inflammation in 3/33 roots (9%). The lower incidence of periapical inflammation in the immediately-filled roots was statistically significant (Pearson chi square,  $p = 0,020$ ). The coronal exposure and inoculation in the experimental group resulted in the development of severe inflammation in 5/ 65 roots (8%).

The 13 specimens with Epiphany™ sealer extruded into the periapical tissues showed formation of a fibrous capsule around the material, associated with mononuclear inflammatory infiltrate at the periphery. Nine of these specimens had a mild reaction, and four specimens with large amounts of extruded material had a moderate inflammatory reaction accompanied by the presence of foreign body giant cells.

Histomorphometry evidenced a statistically significant correlation between periodontal ligament thickness and the level of periapical inflammation. The average thickness found in roots without periapical inflammation was 279  $\mu\text{m}$ , in mild inflammation 323  $\mu\text{m}$  and with severe inflammation 496  $\mu\text{m}$ .

Measurements of the apical area of secondary cementum deposition showed a statistically significant increase in roots treated with chlorhexidine gel medication. Statistical analysis evidenced a direct correlation between this parameter and the presence of periapical inflammation.

### Legends to Figures, Graphics and Tables

- Figure 61. Radiographic control at 3 months. A) 1<sup>st</sup> quadrant with positive control (arrow); B) 2<sup>nd</sup> quadrant, negative controls (arrows); C) and D) mandible, test group teeth.
- Figure 62. Radiographic control at 6 months after inoculation. A) 1<sup>st</sup> quadrant, negative controls; B) 2<sup>nd</sup> quadrant, augmented apical thickness of the *lamina dura* (arrow); C) e D) mandible, test group teeth.
- Figures 63. Light microscopy images of the periapical region of a vital pulp dog's premolar. Radicular dentin (1), apical cementum (2), periodontal ligament (black arrow), alveolar bone (3), dental nerve (white arrow) and blood vessels (red arrows).

- Figure 64. Light microscopy images of successive magnifications of a sample from the positive control group. A) Severe periapical inflammation; B) Augmented thickness of the periodontal ligament; C) Abundant neovessels (arrows); D) Resorption of radicular cementum and dentin (arrows); E) Presence of fibroblasts and collagen (arrow); F) Inflammatory infiltrate mainly composed of mononuclear cells.
- Figure 65. Severe inflammatory infiltrate, magnifications of the same sample. A) Augmented periodontal ligament thickness (white arrows) and presence of debris inside the root canal (black arrow); B) Inflammatory infiltrate dominated by mononuclear cells, with neovessels formation (white arrows), fibroblasts and resorption of the radicular cementum and dentin.
- Figure 66. Images of light microscopy of a sample without morphological evidence of the presence of inflammatory infiltrate. A) Physiological architecture of the periapical tissues where we highlight the dental nerve trajectory (arrow); B) Complete closure of the *apical foramen* and presence of dentin chips at the apical portion of the canal (arrow); C) Multiple cementum deposition lines (black arrows) and normal adjacent periodontal ligament (blue arrow); D) Secondary cementum layer closing *apical foramen*; E) Secondary cementum with cementocytes inside (black arrow) and cementoblasts in the surface (white arrow); F) Dentinal tubule trajectory near the apical part of the root canal wall.
- Figure 67. Light microscopy images of a sample without morphological signs of inflammation. A) Physiological architecture of the periodontal ligament with characteristic space separation from alveolar bone near the apex (arrows); B) Filling of the cemental canal with Epiphany™ sealer, in direct contact with collagen fibers from periodontal ligament (arrow).
- Figure 68. Images of a specimen of the negative control group 1 without periapical inflammation. A) General view of the apical region where an assymetric layer of Epiphany™ sealer around the Resilon™ core material is visible (white arrows). Also noticeable is the permanence of pulp tissue residue in the apical ending of the canal and signs of possible Epiphany™ primer pooling (yellow arrow). B) Sharpey's fibers connecting cementum to alveolar bone (arrow).
- Figure 69. Images of successive magnifications of the same sample, showing mild periapical inflammation. A) Physiological architecture of the al-

veolar bone; B) Complete apical closure with secondary cementum; C) Inflammatory infiltrate localized at the mesial aspect of the root apex, near ramifications of the dental nerve (arrows); D) Distal aspect of the root apex without signs of inflammation; E) Inflammatory infiltrate near small blood vessels (arrows); F) Inflammatory infiltrate with dominance of mononuclear cells (arrows), morphologically compatible with lymphocytes.

Figure 70. Images of specimen of the negative control group 2 with mild periapical inflammation. A) Complete apical closure with secondary cementum and presence of localized inflammatory infiltrate (black arrow), near the apical delta; B) Root dentin near the canal wall with signs suggesting “hybridization” with Epiphany™ primer and sealer (1).

Figure 71. Image of a specimen from group test 1 highlighting the root canal preparation without pulpal debris and absence of periapical inflammation.

Graphic 9. Average and standard deviation of periodontal ligament thickness in negative control groups.

Figure 72. Image of a sample from group test 1 with mild periapical inflammation. Significant deposition of apical secondary cementum (black arrow) and a large blood vessel (blue arrow).

Figure 73. Images of a specimen from group test 1 without signs of periapical inflammation. A) Closure of the *foramen* with hard tissue up to the limit of the root filling material (black arrow). B) Multiple lines of secondary cementum deposition (black arrows) and signs of osteoblastic activity in the alveolar bone (white arrows).

Figure 74. Images of specimen from group test 1 with mild periapical inflammation. A) Filling of the *foramina* with Epiphany™ sealer (black arrows), apical closure with secondary cementum (blue arrow) and localized inflammatory infiltrate (yellow arrow); b) Presence of localized inflammatory infiltrate (yellow arrow), macrophages (black arrow) and secondary cementum.

Figure 75. Images of a sample from group test 1 with severe inflammatory infiltrate. A) Augmented periodontal ligament thickness and “disorganization” of the fat bone marrow tissue (arrows); B) Inflammatory infiltrate with dominance of mononuclear cells, neovessels and areas of root resorption (arrow).

Figure 76. Images of a specimen from group test 1 with severe inflammatory infiltrate. A) Cemental canal filled with inflammatory infiltrate

(black arrow) and *foramen* closed by secondary cementum (white arrow); B) Greater magnification highlighting polymorphonuclear inflammatory cells (white arrow) and neovessels.

Figure 77. Light microscopy images of a sample from group test 2 showing mild inflammatory infiltrate. A) and B) Showing the complete closure of the apex with secondary cementum (black arrows); C) Secondary cementum deposition associated with an area free from inflammation of the periodontal ligament (black arrow); D) Cementocytes (black arrow) and cementoblast (white arrow) inside secondary cementum; E) and F) Inflammatory cells foci (black arrow) and neovessels (white arrow) near apical *foramen* closed with secondary cementum.

Figure 78. Images of a specimen from test group 2 showing mild inflammatory infiltrate. A) Intense deposition of secondary cementum with apical closure (black arrows) and maintenance of the alveolar bone architecture; B) Inflammatory infiltrate localized in the proximity of an area rich in nervous tissue (yellow arrows) and preserved morphology of the fat bone marrow (black arrows).

Figure 79. Image of a specimen from group test 2 showing mild inflammatory infiltrate. Partial obliteration of the *foramina* with hard tissue (black arrows), complete apical closure, multiple lines of secondary cementum deposition and inflammatory infiltrate (red arrow).

Figure 80. Image of a specimen from group test 2 showing mild inflammatory infiltrate. Abundant deposition of secondary cementum, partial apical closure and presence of inflammatory infiltrate near an apical *foramen* (black arrow).

Graphic 9. Average and standard deviation of periodontal ligament thickness in test groups.

Table 11. Scores of periapical inflammation observed in the experimental groups.

Graphic 10. Scores of periapical inflammation observed in the experimental groups.

Table 12. Observed scores for histological parameters closure of apical *foramina*, hard tissues resorption and phagocytic cells.

Graphic 11. Closure of apical *foramina*.

Graphic 12. Hard tissues resorption.

Graphic 13. Presence of phagocytic cells.

Table 13. Results of the histomorphometric analysis.

Figure 81. Images of light microscopy of a specimen with Epiphany™ sealer overfilling into the periapical tissues, facilitated by a previous over-

instrumentation. A and B) large deposition of secondary cementum near the overinstrumented area (black arrow) and Epiphany™ sealer agglomerate (blue arrow) in the periapical tissues; C) area of dense inflammatory infiltrate (yellow arrow); D) fibrous tissue capsule (blue arrow) surrounding Epiphany™ sealer, with inflammatory cells in the proximity; E and F) detail of the capsule (blue arrow), mononuclear inflammatory cells (yellow arrow) and macrophages (red arrow).

Figure 82. Light microscopy images of a serial section of the same specimen, approximately 100 µm distant from the previous figure. A) highlighting the apical cementum destruction induced by overinstrumentation (black arrows) and Epiphany™ sealer forced into the periapical tissues (blue arrow) surrounded by inflammatory infiltrate (yellow arrows); B) Giant foreign body cells (black arrows) at periphery of the extravased Epiphany™ sealer.

Figure 83. Light microscopy images of a serial section of the same specimen, approximately 100 µm further on from previous section. A) fibrous capsule (black arrow) surrounding extravased material (blue arrow) with inflammatory infiltrate in the proximity (yellow arrow); B) Detail of a fragment of cellular cementum (1) Displaced into the periapical tissues by the overinstrumentation, macrophages (red arrow) and erythrocytes (green arrow).

Figure 84. Light microscopy image highlighting mononuclear inflammatory cells (black arrows), macrophages showing signs compatible with Epiphany™ sealer phagocytosis (red arrow), and a blood vessel nearby (green arrow)

Figure 85. Light microscopy image highlighting active resorption of the alveolar bone in the periapical region. Bone *trabeculae*, osteocyte (white arrow) and osteoclast (black arrow).

Figure 86. Light microscopy images of a specimen with extravased Epiphany™ sealer. A) Inflammatory reaction localized around two agglomerates of Epiphany™ sealer extravased into the periapical tissue (black arrows); B) serial section tangential to the organized fibrous capsule around extravased material (black arrows), large concentration of mononuclear inflammatory cells (yellow arrows) a foreign body giant cell (green arrow).

Graphic 14. Intensity of tissular reaction to the extruded materials.



### Conclusions of the *In vivo* Study

Based on the *in vivo* experimental method used and the results obtained it was concluded that:

1 – The study rejected the null hypothesis, in that intracanal medication with 2% chlorhexidine gel did not confer an additional protection against the development of apical periodontitis in root canals exposed to coronal microbial ingress. In fact, canals filled in one-step without such medication had a lower incidence of periapical inflammation.

2 – Root filling with Resilon™/Epiphany™ did not prevent development of severe periapical inflammation in 8% of the roots, suggesting that it can be permeable to microbial ingress.

3 – Histomorphometry allowed quantitative evaluation of the inflammatory periapical reaction. The increase in inflammation was directly proportional to the thickness of the periodontal ligament and of the secondary cementum. These two parameters were increased in the roots medicated with 2% chlorhexidine gel.

4 – Periapical extrusion of the Epiphany™ sealer intensified the inflammatory response.

No correlation was found between the results of the *in vitro* and *in vivo* studies, as the protection against microbial ingress conferred by intracanal medication with 2% chlorhexidine gel, observed in the *in vitro* study, was not evident in the *in vivo* study. This finding corroborated previous reports on the questionable clinical validity of *in vitro* microbial leakage models.



## **V – Bibliografia**

---



## Bibliografia

- Abou-Rass M, Patonai FJ, Jr. (1982). "The effects of decreasing surface tension on the flow of irrigating solutions in narrow root canals." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 53(5): 524-6.
- ADA (2004). "Combating antibiotic resistance." J Am Dent Assoc 135(4): 484-7.
- Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ (1988). "Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria." J Periodontol 59(4): 222-30.
- Akamine A, Hashiguchi I, Toriya Y, Maeda K (1994). "Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions." Endod Dent Traumatol 10(3): 121-8.
- al-Khatib ZZ, Baum RH, Morse DR, Yesilsoy C, Bhambhani S, Furst ML (1990). "The antimicrobial effect of various endodontic sealers." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 70(6): 784-90.
- Allinger NL, et al (1978). "Química orgânica." 2.<sup>a</sup> edição. Ed Guanabara koogan. Rio de Janeiro.
- Andersen M, Lund A, Andreasen JO, Andreasen FM (1992). "In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite." Endod Dent Traumatol 8(3): 104-8.
- Ando N, Hoshino E (1990). "Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin." Int Endod J 23(1): 20-7.
- Andreasen JO, Rud J (1972). "A histobacteriologic study of dental and periapical structures after endodontic surgery." Int J Oral Surg 1(5): 272-81.
- ANSI/ADA (2000). "Specification nº 57 Endodontic Sealing Material." Chicago, USA: ANSI/ADA.
- Armitage GC, Ryder MI, Wilcox SE (1983). "Cemental changes in teeth with heavily infected root canals." J Endod 9(4): 127-30.
- Babich H, Wurzbarger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L (1995). "An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells." Cell Biol Toxicol 11(2): 79-88.
- Barbosa CA, Goncalves RB, Siqueira JF, Jr., De Uzeda M (1997). "Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study." J Endod 23(5): 297-300.

- Barbosa SV, Araki K, Spangberg LS (1993). "Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 75(3): 357-61.
- Barrieshi KM, Walton RE, Johnson WT, Drake DR (1997). "Coronal leakage of mixed anaerobic bacteria after obturation and post space preparation." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 84(3): 310-4.
- Barthel CR, Moshonov J, Shuping G, Ørstavik D (1999). "Bacterial leakage versus dye leakage in obturated root canals." Int Endod J 32(5): 370-5.
- Barthel CR, Zimmer S, West G, Roulet JF (2000). "Bacterial leakage in obturated root canals following the use of different intracanal medicaments." Endod Dent Traumatol 16(6): 282-6.
- Basrani B, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, Lawrence HP, Friedman S (2002). "Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 94(2): 240-5.
- Basrani B, Tjaderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, Friedman S (2003). "Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 96(5): 618-24.
- Basrani B, Ghanem A, Tjaderhane L (2004). "Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications." J Endod 30(6): 413-7.
- Baumgartner JC, Mader CL (1987). "A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens." J Endod 13(4): 147-57.
- Baumgartner G (2002). Endodontic Microbiology and Treatment of Infections. In: Cohen S, Burns RC editors. "Pathways of the Pulp." Eighth edition. Mosby Inc. St. Louis. 501-519.
- Becker TD, Woollard GW (2001). "Endodontic irrigation." Gen Dent 49(3): 272-6.
- Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J (1997). "The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue." Periodontol 2000 13: 20-40.
- Berbert FL, Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru Filho M, Bramante CM (2002). "Influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 93(2): 184-9.
- Berg JO, Blomlof L, Lindskog S (1990). "Cellular reactions in pulpal and periodontal tissues after periodontal wound debridement." J Clin Periodontol 17(3): 165-73.
- Bergenholtz G (1990). "Pathogenic mechanisms in pulpal disease." J Endod 16(2): 98-101.
- Bergenholtz G, Spangberg L (2004). "Controversies in Endodontics." Crit Rev Oral Biol Med 15(2): 99-114.
- Biggs SG, Knowles KI, Ibarrola JL, Pashley DH (2006). "An in vitro assessment of the sealing ability of resilon/epiphany using fluid filtration." J Endod 32(8): 759-61.
- Bilginer S, Esener T, Soylemezoglu F, Tiftik AM (1997). "The investigation of biocompatibility and apical microleakage of tricalcium phosphate based root canal sealers." J Endod 23(2): 105-9.
- Booth IR (1985). "Regulation of cytoplasmic pH in bacteria." Microbiol Rev 49(4): 359-78.
- Bouillaguet S, Troesch S, Wataha JC, Krejci I, Meyer JM, Pashley DH (2003). "Microtensile bond strength between adhesive cements and root canal dentin." Dent Mater 19(3): 199-205.
- Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE (2006). "Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers." J Endod 32(10): 989-92.



- Bouillaguet S, Shaw L, Barthelemy J, Krejci I, Wataha JC (2008). "Long-term sealing ability of Pulp Canal Sealer, AH-Plus, GuttaFlow and Epiphany." Int Endod J 41(3): 219-26.
- Brackett MG, Martin R, Sword J, Oxford C, Rueggeberg FA, Tay FR, Pashley DH (2006). "Comparison of seal after obturation techniques using a polydimethylsiloxane-based root canal sealer." J Endod 32(12): 1188-90.
- Brannstrom M (1984). "Smear layer: pathological and treatment considerations." Oper Dent Suppl 3: 35-42.
- Briggs PF, Scott BJ (1997). "Evidence-based dentistry: endodontic failure--how should it be managed?" Br Dent J 183(5): 159-64.
- Brown LR, Jr, Rudolph CE, Jr. (1957). "Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 10(10): 1094-9.
- Brynolf I (1967). "A histological and roentgenological study of the periapical region of upper incisors." Odont Revy 18: 1-97.
- Byström A, Sundqvist G (1981). "Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy." Scand J Dent Res 89(4): 321-8.
- Byström A, Sundqvist G (1983). "Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 55(3): 307-12.
- Byström A, Claesson R, Sundqvist G (1985). "The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals." Endod Dent Traumatol 1(5): 170-5.
- Byström A, Sundqvist G (1985). "The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy." Int Endod J 18(1): 35-40.
- Caliskan MK, Sen BH (1996). "Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using calcium hydroxide: a long-term study." Endod Dent Traumatol 12(5): 215-21.
- Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldini S, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L (2007). "Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro." J Dent Res 86(1): 90-4.
- Carrotte P (2004). "Endodontics: Part 8. Filling the root canal system." Br Dent J 197(11): 667-72.
- Carvalho RM, Pereira JC, Yoshiyama M, Pashley DH (1996). "A review of polymerization contraction: the influence of stress development versus stress relief." Oper Dent 21(1): 17-24.
- Carver K, Nusstein J, Reader A, Beck M (2007). "In vivo antibacterial efficacy of ultrasound after hand and rotary instrumentation in human mandibular molars." J Endod 33(9): 1038-43.
- Chailertvanitkul P, Saunders WP, Mackenzie D (1996). "An assessment of microbial coronal leakage in teeth root filled with gutta-percha and three different sealers." Int Endod J 29(6): 387-92.
- Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH (2005). "Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA." Biomaterials 26(7): 745-53.
- Chavez de Paz L (2007). "Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities." J Endod 33(6): 652-62.

- Chen SC, Chueh LH, Hsiao CK, Tsai MY, Ho SC, Chiang CP (2007). "An epidemiologic study of tooth retention after nonsurgical endodontic treatment in a large population in Taiwan." J Endod 33(3): 226-9.
- Cheung GS (1996). "Endodontic failures--changing the approach." Int Dent J 46(3): 131-8.
- Chivian N (2004). "Resilon--the missing link in sealing the root canal." Compend Contin Educ Dent 25(10A): 823-4, 826.
- Chow TW (1983). "Mechanical effectiveness of root canal irrigation." J Endod 9(11): 475-9.
- Chu FC, Tsang CS, Chow TW, Samaranayake LP (2005). "Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space." J Endod 31(6): 424-9.
- Chugal NM, Clive JM, Spangberg LS (2001). "A prognostic model for assessment of the outcome of endodontic treatment: Effect of biologic and diagnostic variables." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 91(3): 342-52.
- Chugal NM, Clive JM, Spangberg LS (2007). "Endodontic treatment outcome: effect of the permanent restoration." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 104(4): 576-82.
- Chung HA, Titley K, Torneck CD, Lawrence HP, Friedman S (2001). "Adhesion of glass-ionomer cement sealers to bovine dentin conditioned with intracanal medications." J Endod 27(2): 85-8.
- Cobankara FK, Adanir N, Belli S, Pashley DH (2002). "A quantitative evaluation of apical leakage of four root-canal sealers." Int Endod J 35(12): 979-84.
- Conner DA, Caplan DJ, Teixeira FB, Trope M (2007). "Clinical outcome of teeth treated endodontically with a nonstandardized protocol and root filled with resilon." J Endod 33(11): 1290-2.
- Cortellini P, Tonetti MS (2001). "Evaluation of the effect of tooth vitality on regenerative outcomes in infrabony defects." J Clin Periodontol 28(7): 672-9.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science 284(5418): 1318-22.
- Cunningham WT, Balekjian AY (1980). "Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 49(2): 175-7.
- Cvek M (1992). "Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study." Endod Dent Traumatol 8(2): 45-55.
- D'Arcangelo C, Di Nardo Di Maio F, Stracci N, Spoto G, Malagnino VA, Caputi S (2007). "Pulp-dissolving ability of several endodontic irrigants: a spectrophotometric evaluation." Int J Immunopathol Pharmacol 20(2): 381-6.
- Dahlen G, Magnusson BC, Moller A (1981). "Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*." Arch Oral Biol 26(7): 591-8.
- Dahlen G, Fabricius L, Heyden G, Holm SE, Moller AJ (1982a). "Apical periodontitis induced by selected bacterial strains in root canals of immunized and nonimmunized monkeys." Scand J Dent Res 90(3): 207-16.
- Dahlen G, Fabricius L, Holm SE, Moller AJ (1982b). "Circulating antibodies after experimental chronic infection in the root canal of teeth in monkeys." Scand J Dent Res 90(5): 338-44.

- Dahlen G (1998). "Microbiology of Apical Periodontitis." In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, editors. Essential Endodontology: Prevention and treatment of apical periodontitis. Blackwell Science Ltd. First edition, Oxford.
- Dai XF, Ten Cate AR, Limeback H (1991). "The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine." Arch Oral Biol 36(10): 775-8.
- Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ (2005). "In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 99(6): 768-72.
- Davis JM, Maki J, Bahcall JK (2007). "An in vitro comparison of the antimicrobial effects of various endodontic medicaments on *Enterococcus faecalis*." J Endod 33(5): 567-9.
- De-Deus G, Brandao MC, Fidel RA, Fidel SR (2007). "The sealing ability of GuttaFlow in oval-shaped canals: an ex vivo study using a polymicrobial leakage model." Int Endod J 40(10): 794-9.
- Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L (1995). "Bacteremia in conjunction with endodontic therapy." Endod Dent Traumatol 11(3): 142-9.
- Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW (1982). "The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 53(5): 518-23.
- Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K (2002). "Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis." Int Endod J 35(4): 321-9.
- Emilson CG (1977). "Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine." Scand J Dent Res 85(4): 255-65.
- Engstrom B, Frostell G (1961). "Bacteriological studies of the non-vital pulp in cases with intact pulp cavities." Acta Odontol Scand 19: 23-39.
- Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K (2004). "Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study." J Endod 30(2): 84-7.
- Erdemir A, Ari H, Gungunes H, Belli S (2004). "Effect of medications for root canal treatment on bonding to root canal dentin." J Endod 30(2): 113-6.
- Eriksen HM, Ørstavik D, Kerekes K (1988). "Healing of apical periodontitis after endodontic treatment using three different root canal sealers." Endod Dent Traumatol 4(3): 114-7.
- Eriksen HM (2008). Epidemiology of Apical Periodontitis. Essential Endodontology: prevention and treatment of apical periodontitis. Ørstavik DPFT. Oxford, Blackwell Munksgaard Ltd: 262-271.
- Estrela C, Bueno MR, Leles CR, Azevedo B, Azevedo JR (2008). "Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic and periapical radiography for detection of apical periodontitis." J Endod 34(3): 273-9.
- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002). "Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide." Int Endod J 35(3): 221-8.
- Evans MD, Baumgartner JC, Khemalelakul SU, Xia T (2003). "Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin." J Endod 29(5): 338-9.

- Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJ (1982a). "Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys." Scand J Dent Res 90(3): 200-6.
- Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Moller AJ (1982b). "Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure." Scand J Dent Res 90(2): 134-44.
- Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP, Moller AJ (2006). "Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth." Eur J Oral Sci 114(4): 278-85.
- Fager FK, Messer HH (1986). "Systemic distribution of camphorated monochlorophenol from cotton pellets sealed in pulp chambers." J Endod 12(6): 225-30.
- Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001). "In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant." J Endod 27(7): 452-5.
- Ferreira FB, Campos Rabang HR, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ, Gomes BP (2006). "Root canal microbiota of dogs' teeth with periapical lesions induced by two different methods." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 102(4): 564-70.
- Figdor D, Davies JK, Sundqvist G (2003). "Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum." Oral Microbiol Immunol 18(4): 234-9.
- Figdor D, Sundqvist G (2007). "A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora." Aust Dent J 52(1 Suppl): S38-51.
- Fouad AF (2002). "Are antibiotics effective for endodontic pain? An evidence-based review." Endod Topics 3: 52-66.
- Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS (2005). "Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 99(1): 112-8.
- Friedman S, Löst C, Zarrabian M, Trope M (1995). "Evaluation of success and failure after endodontic therapy using a glass ionomer cement sealer." J Endod 21(7): 384-90.
- Friedman S, Torneck CD, Komorowski R, Ouzounian Z, Syrtash P, Kaufman A (1997). "In vivo model for assessing the functional efficacy of endodontic filling materials and techniques." J Endod 23(9): 557-61.
- Friedman S (1998). Treatment outcome and prognosis of endodontic therapy. Essential Endodontology. Ørstavik DPFT. Oxford, Blackwell science Ltd: 367-401.
- Friedman S, Komorowski R, Maillet W, Klimaite R, Nguyen HQ, Torneck CD (2000). "In vivo resistance of coronally induced bacterial ingress by an experimental glass ionomer cement root canal sealer." J Endod 26(1): 1-5.
- Friedman S (2008). Expected outcomes in the prevention and treatment of apical periodontitis. Essential endodontology - prevention and treatment of apical periodontitis. Ørstavik DPFT. Oxford, Blackwell Munksgaard Ltd: 408-454.
- Garberoglio R, Brannstrom M (1976). "Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules." Arch Oral Biol 21(6): 355-62.
- Garvey LH, Roed-Petersen J, Husum B (2001). "Anaphylactic reactions in anaesthetised patients - four cases of chlorhexidine allergy." Acta Anaesthesiol Scand 45(10): 1290-4.

- Gatewood RS, Himel VT, Dorn SO (1990). "Treatment of the endodontic emergency: a decade later." J Endod 16(6): 284-91.
- Gesi A, Raffaelli O, Goracci C, Pashley DH, Tay FR, Ferrari M (2005). "Interfacial strength of Resilon and gutta-percha to intraradicular dentin." J Endod 31(11): 809-13.
- Geurtsen W, Leinenbach F, Krage T, Leyhausen G (1998). "Cytotoxicity of four root canal sealers in permanent 3T3 cells and primary human periodontal ligament fibroblast cultures." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 85(5): 592-7.
- Geurtsen W, Spahl W, Muller K, Leyhausen G (1999). "Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals." J Biomed Mater Res 48(6): 772-7.
- Ginsburg I (2002). "Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation." Lancet Infect Dis 2(3): 171-9.
- Gish SP, Drake DR, Walton RE, Wilcox L (1994). "Coronal leakage: bacterial penetration through obturated canals following post preparation." J Am Dent Assoc 125(10): 1369-72.
- Goldman M, Simmonds S, Rush R (1989). "The usefulness of dye-penetration studies reexamined." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 67(3): 327-32.
- Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD (1994). "Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals." Microbios 80(325): 231-43.
- Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001). "In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*." Int Endod J 34(6): 424-8.
- Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ (2003). "Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro." Int Endod J 36(4): 267-75.
- Gomes BP, Vianna ME, Matsumoto CU, Rossi Vde P, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ (2005). "Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 100(4): 512-7.
- Gomes BP, Berber VB, Montagner F, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ (2007). "Residual effects and surface alterations in disinfected gutta-percha and Resilon cones." J Endod 33(8): 948-51.
- Green TL, Walton RE, Taylor JK, Merrell P (1997). "Radiographic and histologic periapical findings of root canal treated teeth in cadaver." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 83(6): 707-11.
- Gutmann JL, Witherspoon DE (2002). Obturation of the cleaned and shaped root canal system. In Cohen S, Burns R editors. Pathways of the Pulp. Eighth edition. St. Louis, Mosby: 293-364.
- Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP (2000). "Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study." Int Endod J 33(2): 126-31.
- Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T (2007). "Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments." J Endod 33(8): 917-25.
- Haikel Y, Wittenmeyer W, Bateman G, Bentaleb A, Allemann C (1999). "A new method for the quantitative analysis of endodontic microleakage." J Endod 25(3): 172-7.
- Hammad M, Qualtrough A, Silikas N (2007). "Effect of new obturating materials on vertical root fracture resistance of endodontically treated teeth." J Endod 33(6): 732-6.
- Hammad M, Qualtrough A, Silikas N (2008). "Extended setting shrinkage behavior of endodontic sealers." J Endod 34(1): 90-3.

- Hancock HH, 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J (2001). "Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 91(5): 579-86.
- Hansen MG (1998). "Relative efficiency of solvents used in endodontics." J Endod 24(1): 38-40.
- Happonen RP, Soderling E, Viander M, Linko-Kettunen L, Pelliniemi LJ (1985). "Immunocytochemical demonstration of Actinomyces species and Arachnia propionica in periapical infections." J Oral Pathol 14(5): 405-13.
- Hashieh IA, Pommel L, Camps J (1999). "Concentration of eugenol apically released from zinc oxide-eugenol-based sealers." J Endod 25(11): 713-5.
- Haug SR, Heyeraas KJ (2003). "Effects of sympathectomy on experimentally induced pulpal inflammation and periapical lesions in rats." Neuroscience 120(3): 827-36.
- Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR (2005). "Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo." J Dent Res 84(8): 741-6.
- Heling I, Chandler NP (1998). "Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules." Int Endod J 31(1): 8-14.
- Hiraishi N, Loushine RJ, Vano M, Chieffi N, Weller RN, Ferrari M, Pashley DH, Tay FR (2006). "Is an oxygen inhibited layer required for bonding of resin-coated gutta-percha to a methacrylate-based root canal sealer?" J Endod 32(5): 429-33.
- Hiraishi N, Yau JY, Loushine RJ, Armstrong SR, Weller RN, King NM, Pashley DH, Tay FR (2007). "Susceptibility of a polycaprolactone-based root canal-filling material to degradation. III. Turbidimetric evaluation of enzymatic hydrolysis." J Endod 33(8): 952-6.
- Holland R, Nery MJ, de Mello W, de Souza V, Bernabe PF, Otoboni Filho JA (1979). "Root canal treatment with calcium hydroxide. II. Effect of instrumentation beyond the apices." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 47(1): 93-6.
- Holland R, de Souza V (1985). "Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation." J Endod 11(12): 535-43.
- Holland R, Otoboni Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Dezan E, Jr. (2003). "A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis." J Endod 29(2): 121-4.
- Holland R, Sant'Anna Junior A, Souza V, Dezan Junior E, Otoboni Filho JA, Bernabe PF, Nery MJ, Murata SS (2005). "Influence of apical patency and filling material on healing process of dogs' teeth with vital pulp after root canal therapy." Braz Dent J 16(1): 9-16.
- Hommez GM, Coppens CR, De Moor RJ (2002). "Periapical health related to the quality of coronal restorations and root fillings." Int Endod J 35(8): 680-9.
- Hommez GM, Verhelst R, Claeys G, Vaneechoutte M, De Moor RJ (2004). "Investigation of the effect of the coronal restoration quality on the composition of the root canal microflora in teeth with apical periodontitis by means of T-RFLP analysis." Int Endod J 37(12): 819-27.
- Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S (2002). "Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses." Nat Immunol 3(11): 1033-40.
- Hoshino E, Ando N, Sato M, Kota K (1992). "Bacterial invasion of non-exposed dental pulp." Int Endod J 25(1): 2-5.



- Hoskinson SE, Ng YL, Hoskinson AE, Moles DR, Gulabivala K (2002). "A retrospective comparison of outcome of root canal treatment using two different protocols." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 93(6): 705-15.
- Hsieh YD, Gau CH, Kung Wu SF, Shen EC, Hsu PW, Fu E (2007). "Dynamic recording of irrigating fluid distribution in root canals using thermal image analysis." Int Endod J 40(1): 11-7.
- Huang J, Wong HL, Zhou Y, Wu XY, Grad H, Komorowski R, Friedman S (2000). "In vitro studies and modeling of a controlled-release device for root canal therapy." J Control Release 67(2-3): 293-307.
- Hulsmann M, Hahn W (2000). "Complications during root canal irrigation--literature review and case reports." Int Endod J 33(3): 186-93.
- Huomonen S, Lenander-Lumikari M, Sigurdsson A, Ørstavik D (2003). "Healing of apical periodontitis after endodontic treatment: a comparison between a silicone-based and a zinc oxide-eugenol-based sealer." Int Endod J 36(4): 296-301.
- Inamoto K, Kojima K, Nagamatsu K, Hamaguchi A, Nakata K, Nakamura H (2002). "A survey of the incidence of single-visit endodontics." J Endod 28(5): 371-4.
- Infopedia S. (2007). "José d'Almeida." 2007, from [http://infopedia.nlm.gov.sg/articles/SIP\\_102\\_2005-01-18.html](http://infopedia.nlm.gov.sg/articles/SIP_102_2005-01-18.html).
- Ingle JI (2002). Obturation of the radicular space. In: Ingle J, Bakland LK, editors. Endodontics. Hamilton, BC Decker Inc. 577-581.
- Isci S, Yoldas O, Dumani A (2006). "Effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine solutions on Resilon (synthetic polymer based root canal filling material) cones: an atomic force microscopy study." J Endod 32(10): 967-9.
- Jeansonne MJ, White RR (1994). "A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants." J Endod 20(6): 276-8.
- Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz G (1995). "Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp." J Dent Res 74(5): 1162-7.
- Kabashima H, Nagata K, Maeda K, Iijima T (2002). "Involvement of substance P, mast cells, TNF-alpha and ICAM-1 in the infiltration of inflammatory cells in human periapical granulomas." J Oral Pathol Med 31(3): 175-80.
- Kaga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H (2001). "The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells." Dent Mater 17(4): 333-9.
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965). "The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 20: 340-9.
- Katebzadeh N, Hupp J, Trope M (1999). "Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs." J Endod 25(5): 364-8.
- Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad AF (2005). "Enterococcus spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions." J Endod 31(12): 851-6.

- Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H (1996). "Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study." J Endod 22(6): 311-6.
- Kawashima NS, H (2008). Immunopathological aspects of pulpal and periapical inflammations. In Ørstavik D, Pitt Ford TR editors. Essential Endodontology: Prevention and treatment of apical periodontitis. Second edition. Oxford, Blackwell Munksgaard: 44-80.
- Kersten HW, Wesselink PR, Thoden van Velzen SK (1987). "The diagnostic reliability of the buccal radiograph after root canal filling." Int Endod J 20(1): 20-4.
- Key JE, Rahemtulla FG, Eleazer PD (2006). "Cytotoxicity of a new root canal filling material on human gingival fibroblasts." J Endod 32(8): 756-8.
- Khayat A, Lee SJ, Torabinejad M (1993). "Human saliva penetration of coronally unsealed obturated root canals." J Endod 19(9): 458-61.
- Kim JS, Baek SH, Bae KS (2004). "In vivo study on the biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers." J Endod 30(10): 708-11.
- Kimberly CL, Byers MR (1988). "Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting." Anat Rec 222(3): 289-300.
- Kishen A, Chen NN, Tan L, Asundi A (2004). "Chairside sensor for rapid monitoring of Enterococcus faecalis activity." J Endod 30(12): 872-5.
- Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K (1990). "The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis." Int Endod J 23(2): 100-6.
- Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J (2004). "Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities." Vaccine 22(7): 822-30.
- Kolokouris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas I (1998). "In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats." J Endod 24(2): 82-5.
- Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S (2000). "Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin." J Endod 26(6): 315-7.
- Kontakiotis EG, Wu MK, Wesselink PR (1997). "Effect of sealer thickness on long-term sealing ability: a 2-year follow-up study." Int Endod J 30(5): 307-12.
- Kopp W, Schwarting R (1989). "Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue." J Endod 15(2): 72-5.
- Koppang HS, Koppang R, Solheim T, Aarnes H, Stolen SO (1989). "Cellulose fibers from endodontic paper points as an etiological factor in postendodontic periapical granulomas and cysts." J Endod 15(8): 369-72.
- Kurihara H, Kobayashi Y, Francisco IA, Isoshima O, Nagai A, Murayama Y (1995). "A microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions." J Endod 21(12): 617-21.
- Kuttler Y (1955). "Microscopic investigation of root apices." J Am Dent Assoc 50(5): 544-52.
- Kvist T, Molander A, Dahlen G, Reit C (2004). "Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial." J Endod 30(8): 572-6.

- Langeland K, Rodrigues H, Dowden W (1974). "Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 37(2): 257-70.
- Langeland K, Block RM, Grossman LI (1977). "A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens." J Endod 3(1): 8-23.
- Law A, Messer H (2004). "An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments." J Endod 30(10): 689-94.
- Leal JM (1998). Materiais obturadores de canais radiculares. In Leonardo MR, Leal JM editores. Endodontia - tratamento de canais radiculares. São Paulo, Panamericana: 547-566.
- Lebeau A (1953). "L'âge du chien et celui de l'homme. Essais de statistique sur la mortalité canine." Bull Académ Vétér 26: 229-32.
- Lee DY, Spangberg LS, Bok YB, Lee CY, Kum KY (2005). "The sustaining effect of three polymers on the release of chlorhexidine from a controlled release drug device for root canal disinfection." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 100(1): 105-11.
- Lee SJ, Jang KH, Spangberg LS, Kim E, Jung IY, Lee CY, Kum KY (2006). "Three-dimensional visualization of a mandibular first molar with three distal roots using computer-aided rapid prototyping." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 101(5): 668-74.
- Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP, Friedman S (2000). "Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles." J Endod 26(11): 652-5.
- Leonardo MR, Almeida WA, da Silva LA, Utrilla LS (1998). "Histological evaluation of the response of apical tissues to glass ionomer and zinc oxide-eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment." Endod Dent Traumatol 14(6): 257-61.
- Leonardo MR, da Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS (1999). "Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer." Endod Dent Traumatol 15(1): 28-32.
- Leonardo MR, Barnett F, Debelian GJ, de Pontes Lima RK, Bezerra da Silva LA (2007). "Root canal adhesive filling in dogs' teeth with or without coronal restoration: a histopathological evaluation." J Endod 33(11): 1299-303.
- Lewis B (1998). "Formaldehyde in dentistry: a review for the millennium." J Clin Pediatr Dent 22(2): 167-77.
- Lim TS, Wee TY, Choi MY, Koh WC, Sae-Lim V (2003). "Light and scanning electron microscopic evaluation of Glyde File Prep in smear layer removal." Int Endod J 36(5): 336-43.
- Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gangler P, Langeland K (1991). "Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 71(5): 603-11.
- Lin LM, Skribner JE, Gaengler P (1992). "Factors associated with endodontic treatment failures." J Endod 18(12): 625-7.
- Love RM, Chandler NP, Jenkinson HF (1996). "Penetration of smeared or nonsmeared dentine by *Streptococcus gordonii*." Int Endod J 29(1): 2-12.
- Love RM (2001). "Enterococcus faecalis--a mechanism for its role in endodontic failure." Int Endod J 34(5): 399-405.
- Love RM (2002a). "Bacterial adhesins--their role in tubule invasion and endodontic disease." Aust Endod J 28(1): 25-8.

- Love RM (2002b). "The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine." Oral Microbiol Immunol 17(1): 32-7.
- Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD (1984). "Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls." J Endod 10(10): 477-83.
- Madison S, Swanson K, Chiles SA (1987). "An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth. Part II. Sealer types." J Endod 13(3): 109-12.
- Madison S, Wilcox LR (1988). "An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth. Part III. In vivo study." J Endod 14(9): 455-8.
- Magura ME, Kafrawy AH, Brown CE, Jr., Newton CW (1991). "Human saliva coronal microleakage in obturated root canals: an in vitro study." J Endod 17(7): 324-31.
- Mah T, Basrani B, Santos JM, Pascon EA, Tjaderhane L, Yared G, Lawrence HP, Friedman S (2003). "Periapical inflammation affecting coronally-inoculated dog teeth with root fillings augmented by white MTA orifice plugs." J Endod 29(7): 442-6.
- Mata AD (2003). Influence of magnesium on salivary gland secretion: physiological and pathophysiological studies. PhD Thesis. Preston.
- Marciano J, Michalesco PM (1989). "Dental gutta-percha: chemical composition, X-ray identification, enthalpic studies, and clinical implications." J Endod 15(4): 149-53.
- Mariotti AJ, Rumpf DA (1999). "Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production." J Periodontol 70(12): 1443-8.
- Marquis VL, Dao T, Farzaneh M, Abitbol S, Friedman S (2006). "Treatment outcome in endodontics: the Toronto Study. Phase III: initial treatment." J Endod 32(4): 299-306.
- Marsh PD (2003). "Are dental diseases examples of ecological catastrophes?" Microbiology 149(Pt 2): 279-94.
- Marshall GW, Jr. (1993). "Dentin: microstructure and characterization." Quintessence Int 24(9): 606-17.
- Marton IJ, Kiss C (1993). "Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions." Int Endod J 26(2): 131-6.
- Matloff IR, Jensen JR, Singer L, Tabibi A (1982). "A comparison of methods used in root canal sealability studies." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 53(2): 203-8.
- Matsumoto K, Inoue K, Matsumoto A (1989). "The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture." J Endod 15(2): 60-7.
- McDonnell G, Russell AD (1999). "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance." Clin Microbiol Rev 12(1): 147-79.
- McDougall IG, Patel V, Santerre P, Friedman S (1999). "Resistance of experimental glass ionomer cement sealers to bacterial penetration in vitro." J Endod 25(11): 739-42.
- Merdad K, Pascon AE, Kulkarni G, Santerre P, Friedman S (2007). "Short-term cytotoxicity assessment of components of the epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct contact millipore filter assays." J Endod 33(1): 24-7.
- Messer HH, Chen RS (1984). "The duration of effectiveness of root canal medicaments." J Endod 10(6): 240-5.

- Metzger Z, Abramovitz R, Abramovitz L, Tagger M (2000). "Correlation between remaining length of root canal fillings after immediate post space preparation and coronal leakage." J Endod 26(12): 724-8.
- Miletic I, Anic I, Karlovic Z, Marsan T, Pezelj-Ribaric S, Osmak M (2000). "Cytotoxic effect of four root filling materials." Endod Dent Traumatol 16(6): 287-90.
- Miletic I, Devcic N, Anic I, Borcic J, Karlovic Z, Osmak M (2005). "The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods." J Endod 31(4): 307-9.
- Misawa M, Ohmori S, Yanaura S (1985). "Effects of bromhexine on the secretions of saliva and tears." Jpn J Pharmacol 39(2): 241-50.
- Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T (1998). "Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis." Int Endod J 31(1): 1-7.
- Molander A, Warfvinge J, Reit C, Kvist T (2007). "Clinical and radiographic evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial." J Endod 33(10): 1145-8.
- Moller AJ (1966). "Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies." Odontol Tidskr 74(5): Suppl:1-380.
- Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G (1981). "Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys." Scand J Dent Res 89(6): 475-84.
- Molven O, Olsen I, Kerekas K (1991). "Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions." Endod Dent Traumatol 7(5): 226-9.
- Moorer WR, Wesselink PR (1982). "Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite." Int Endod J 15(4): 187-96.
- Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich WR, Schlossman SF (1985). "The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset." J Immunol 134(3): 1508-15.
- Moshonov J, Trope M, Friedman S (1994). "Retreatment efficacy 3 months after obturation using glass ionomer cement, zinc oxide-eugenol, and epoxy resin sealers." J Endod 20(2): 90-2.
- Mutal L, Gani O (2005). "Presence of pores and vacuoles in set endodontic sealers." Int Endod J 38(10): 690-6.
- Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M (1995). "Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth." J Endod 21(2): 70-3.
- Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G (1990a). "Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study." J Endod 16(12): 580-8.
- Nair PN, Sjögren U, Krey G, Sundqvist G (1990b). "Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth." J Endod 16(12): 589-95.
- Nair PN (1997). "Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response." Periodontol 2000 13: 121-48.
- Nair PN (1998). "New perspectives on radicular cysts: do they heal?" Int Endod J 31(3): 155-60.
- Nair PN, Sjögren U, Sundqvist G (1998). "Cholesterol crystals as an etiological factor in non-resolving chronic inflammation: an experimental study in guinea pigs." Eur J Oral Sci 106(2 Pt 1): 644-50.

- Nair PN, Sjögren U, Figdor D, Sundqvist G (1999). "Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 87(5): 617-27.
- Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J (2005). "Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 99(2): 231-52.
- Nair PN (2006). Endodontic failures: the pathobiology of posttreatment apical periodontitis. Pathways of the pulp. Cohen SH, K M. Missouri, Mosby Elsevier: 918-943.
- Nakata K, Naitoh M, Izumi M, Inamoto K, Aiji E, Nakamura H (2006). "Effectiveness of dental computed tomography in diagnostic imaging of periradicular lesion of each root of a multirooted tooth: a case report." J Endod 32(6): 583-7.
- Nanci A (2003). Dentin pulp-complex. Ten Cate's oral histology, Development, Structure and function. Seventh edition. Elsevier Health Sciences. 192-194.
- Nerwich A, Figdor D, Messer HH (1993). "pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide." J Endod 19(6): 302-6.
- Ninomiya J, Nakanishi K, Takemoto T, Higashi T, Ogawa T, Kawaguchi H, Yoshino H, Hirakawa M, Shiba H, Hino F, Shibata K, Hino T (1997). "Cellular immuno-competence of infected root canal contents in pathogenesis of periapical lesions." J Endod 23(4): 213-6.
- Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S (2002). "Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis." J Endod 28(10): 679-83.
- Okano M, Nomura M, Hata S, Okada N, Sato K, Kitano Y, Tashiro M, Yoshimoto Y, Hama R, Aoki T (1989). "Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate." Arch Dermatol 125(1): 50-2.
- Olgart LM (1992). "Involvement of sensory nerves in hemodynamic reactions." Proc Finn Dent Soc 88 Suppl 1: 403-10.
- Oliver CM, Abbott PV (1991). "Entrapped air and its effects on dye penetration of voids." Endod Dent Traumatol 7(3): 135-8.
- Olsson B, Sliwowski A, Langeland K (1981). "Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials." J Endod 7(8): 355-67.
- Onay EO, Ungor M, Orucoglu H (2006). "An in vitro evaluation of the apical sealing ability of a new resin-based root canal obturation system." J Endod 32(10): 976-8.
- Onay EO, Ungor M, Ozdemir BH (2007). "In vivo evaluation of the biocompatibility of a new resin-based obturation system." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 104(3): e60-6.
- Ørstavik D, Kerekes K, Eriksen HM (1986). "The periapical index: a scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis." Endod Dent Traumatol 2(1): 20-34.
- Ørstavik D, Haapasalo M (1990). "Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules." Endod Dent Traumatol 6(4): 142-9.
- Ørstavik D, Kerekes K, Molven O (1991). "Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study." Int Endod J 24(1): 1-7.
- Ørstavik D (2005). "Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing." Endodontic topics 12: 25-38.



- Ozok AR, van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink PR (2008). "Sealing ability of a new polydimethylsiloxane-based root canal filling material." J Endod 34(2): 204-7.
- Padachey N, Patel V, Santerre P, Cvitkovitch D, Lawrence HP, Friedman S (2000). "Resistance of a novel root canal sealer to bacterial ingress in vitro." J Endod 26(11): 656-9.
- Paque F, Sirtes G (2007). "Apical sealing ability of Resilon/Epiphany versus gutta-percha/AH Plus: immediate and 16-months leakage." Int Endod J 40(9): 722-9.
- Parsons GJ, Patterson SS, Miller CH, Katz S, Kafrawy AH, Newton CW (1980). "Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 49(5): 455-9.
- Pascon EA, Introcaso JH, Langeland K (1987). "Development of predictable periapical lesion monitored by subtraction radiography." Endod Dent Traumatol 3(4): 192-208.
- Pashley DH (1984). "Smear layer: physiological considerations." Oper Dent Suppl 3: 13-29.
- Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH (1985). "Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue." J Endod 11(12): 525-8.
- Pashley DH (1990). Dentin permeability: theory and practice. Experimental endodontics. Spangberg L. Florida, CRC Press: 19-49.
- Pashley DH (1992). "Smear layer: overview of structure and function." Proc Finn Dent Soc 88 Suppl 1: 215-24.
- Pashley DH (1996). "Dynamics of the pulpo-dentin complex." Crit Rev Oral Biol Med 7(2): 104-33.
- Paulo MF (1994). Estudo do remanescente dentinário após instrumentação endodôntica da raiz mesial dos molares mandibulares. Dissertação de Doutorado. Porto.
- Payne MS, Horbett TA (1987). "Complement activation by hydroxyethylmethacrylate-ethylmethacrylate copolymers." J Biomed Mater Res 21(7): 843-59.
- Peculiene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M (2001). "Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis." Int Endod J 34(6): 429-34.
- Pécora ECD (2004). Hipoclorito de sódio. Ciência Endodôntica. Estrela C. São Paulo, Artes Médicas. 1: 415-455.
- Penesis VA, Fitzgerald PI, Fayad MI, Wenckus CS, Begole EA, Johnson BR (2008). "Outcome of One-visit and Two-visit Endodontic Treatment of Necrotic Teeth with Apical Periodontitis: A Randomized Controlled Trial with One-year Evaluation." J Endod 34(3): 251-7.
- Peters LB, Harrison JW (1992). "A comparison of leakage of filling materials in demineralized and non-demineralized resected root ends under vacuum and non-vacuum conditions." Int Endod J 25(6): 273-8.
- Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR (2000). "Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro." Int Endod J 33(1): 28-36.
- Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ (2001). "Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis." J Endod 27(2): 76-81.

- Peters LB (2002). Endodontic infections and apical periodontitis - an analysis of microbial factors prior, during and after endodontic treatment. Cariology Endodontology Pedodontology, Academic Center for Dentistry. PhD Thesis. Amsterdam.
- Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR (2002a). "Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions." Int Endod J 35(1): 13-21.
- Peters LB, Wesselink PR (2002). "Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms." Int Endod J 35(8): 660-7.
- Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ (2002b). "Combinations of bacterial species in endodontic infections." Int Endod J 35(8): 698-702.
- Peters OA, Barbakow F (2000). "Effects of irrigation on debris and smear layer on canal walls prepared by two rotary techniques: a scanning electron microscopic study." J Endod 26(1): 6-10.
- Peutzfeldt A (1997). "Resin composites in dentistry: the monomer systems." Eur J Oral Sci 105(2): 97-116.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2003). "Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions." Int Endod J 36(1): 1-11.
- Pitout E, Oberholzer TG, Blignaut E, Molepo J (2006). "Coronal leakage of teeth root-filled with gutta-percha or Resilon root canal filling material." J Endod 32(9): 879-81.
- Pitt Ford TR (1983). "Relation between seal of root fillings and tissue response." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 55(3): 291-4.
- Pollard BK, Weller RN, Kulild JC (1990). "Standardized technique for linear dye leakage studies: immediate versus delayed immersion times." Int Endod J 23(5): 250-3.
- Porkaew P, Retief DH, Barfield RD, Lacefield WR, Soong SJ (1990). "Effects of calcium hydroxide paste as an intracanal medicament on apical seal." J Endod 16(8): 369-74.
- Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M (2001). "Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin." Int Endod J 34(3): 184-8.
- Portenier I, Haapasalo H, Ørstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M (2002). "Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells." J Endod 28(9): 634-7.
- Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M (2005). "The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments." J Endod 31(5): 380-6.
- Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M (2006). "Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA." J Endod 32(2): 138-41.
- Raina R, Loushine RJ, Weller RN, Tay FR, Pashley DH (2007). "Evaluation of the quality of the apical seal in Resilon/Epiphany and Gutta-Percha/AH Plus-filled root canals by using a fluid filtration approach." J Endod 33(8): 944-7.
- Ramachandran Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE (1996). "Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod 81(1): 93-102.

- Ramos JC (2007). Protecções pulpares directas. Avaliação histopatológica. Tese de Doutoramento. Coimbra.
- Ray HA, Trope M (1995). "Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration." Int Endod J 28(1): 12-8.
- Reit C, Dahlen G (1988). "Decision making analysis of endodontic treatment strategies in teeth with apical periodontitis." Int Endod J 21(5): 291-9.
- Ricucci D, Langeland K (1998). "Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 2. A histological study." Int Endod J 31(6): 394-409.
- Ricucci D, Grondahl K, Bergenholtz G (2000). "Periapical status of root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration or caries." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 90(3): 354-9.
- Ricucci D, Bergenholtz G (2003). "Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries--a histobacteriological study of treated cases." Int Endod J 36(11): 787-802.
- Ricucci D, Mannocci F, Ford TR (2006). "A study of periapical lesions correlating the presence of a radiopaque lamina with histological findings." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 101(3): 389-94.
- Rietschel ET, Brade H (1992). "Bacterial endotoxins." Sci Am 267(2): 54-61.
- Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM (1982). "In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants." J Endod 8(5): 200-4.
- Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K (2004). "Chlorhexidine substantivity in root canal dentin." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 98(4): 488-92.
- Royal MJ, Williamson AE, Drake DR (2007). "Comparison of 5.25% sodium hypochlorite, MTAD, and 2% chlorhexidine in the rapid disinfection of polycaprolactone-based root canal filling material." J Endod 33(1): 42-4.
- Rubach WC, Mitchell DF (1965). "Periodontal Disease, Accessory Canals and Pulp Pathosis." J Periodontol 36: 34-8.
- Safavi KE, Nichols FC (1993). "Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide." J Endod 19(2): 76-8.
- Sagsen B, Er O, Kahraman Y, Orucoglu H (2006). "Evaluation of microleakage of roots filled with different techniques with a computerized fluid filtration technique." J Endod 32(12): 1168-70.
- Saito I, Ishii K, Hanada K, Sato O, Maeda T (1991). "Responses of calcitonin gene-related peptide-immunopositive nerve fibres in the periodontal ligament of rat molars to experimental tooth movement." Arch Oral Biol 36(9): 689-92.
- Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D (2002). "The effects of dentine pretreatment on the adhesion of root-canal sealers." Int Endod J 35(10): 859-66.
- Salehrabi R, Rotstein I (2004). "Endodontic treatment outcomes in a large patient population in the USA: an epidemiological study." J Endod 30(12): 846-50.

- Sasaki H, Okamatsu Y, Kawai T, Kent R, Taubman M, Stashenko P (2004). "The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss." J Periodontal Res 39(6): 432-41.
- Sathorn C, Parashos P, Messer H (2007). "Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis." Int Endod J 40(1): 2-10.
- Saunders WP, Saunders EM (1994). "Coronal leakage as a cause of failure in root-canal therapy: a review." Endod Dent Traumatol 10(3): 105-8.
- Schafer E, Zandbiglari T (2003). "Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva." Int Endod J 36(10): 660-9.
- Schafer E, Bossmann K (2005). "Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against Enterococcus faecalis." J Endod 31(1): 53-6.
- Schilder H (1974). "Cleaning and shaping the root canal." Dent Clin North Am 18(2): 269-96.
- Schmalz G (2003). Root canal filling materials. Textbook of Endodontology. Bergenholtz GH-B, P; Reit, C. Victoria, Blackwell Munksgard: 261-287.
- Schroeder A (1954). "[The impermeability of root canal filling material and first demonstrations of new root filling materials.]." SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd 64(9): 921-31.
- Scott AC, Vire DE, Swanson R (1992). "An evaluation of the Thermafil endodontic obturation technique." J Endod 18(7): 340-3.
- Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB (2004). "Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci." Oral Microbiol Immunol 19(2): 95-101.
- Sedgley C, Nagel A, Dahlen G, Reit C, Molander A (2006). "Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of Enterococcus faecalis in root canals." J Endod 32(3): 173-7.
- Seltzer S, Turkenkopf S, Vito A, Green D, Bender IB (1964). "A Histologic Evaluation of Periapical Repair Following Positive and Negative Root Canal Cultures." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 17: 507-32.
- Seltzer S, Green DB, Weiner N, DeRenzis F (1972). "A scanning electron microscope examination of silver cones removed from endodontically treated teeth." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 33(4): 589-605.
- Sen BH, Piskin B, Demirci T (1995). "Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM." Endod Dent Traumatol 11(1): 6-9.
- Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS (1997). "Growth patterns of Candida albicans in relation to radicular dentin." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 84(1): 68-73.
- Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS (1999). "Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals." J Endod 25(4): 235-8.
- Sen BH, Akdeniz BG, Denizci AA (2000). "The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on Candida albicans." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 90(5): 651-5.
- Shabahang S, Torabinejad M (2003). "Effect of MTAD on Enterococcus faecalis-contaminated root canals of extracted human teeth." J Endod 29(9): 576-9.
- Shabestari L, Taylor GN, Angus W (1967). "Dental eruption pattern of the Beagle." J Dent Res 46(1): 276-8.

- Shipper G, Ørstavik D, Teixeira FB, Trope M (2004). "An evaluation of microbial leakage in roots filled with a thermoplastic synthetic polymer-based root canal filling material (Resilon)." J Endod 30(5): 342-7.
- Shipper G, Teixeira FB, Arnold RR, Trope M (2005). "Periapical inflammation after coronal microbial inoculation of dog roots filled with gutta-percha or resilon." J Endod 31(2): 91-6.
- Shovelton DH, Sidaway DA (1960). "Infection in root canals." Br Dent J 108: 108-115.
- Shovelton DH (1964). "The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth." Br Dent J 117: 101-107.
- Shuping GB, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M (2000). "Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications." J Endod 26(12): 751-5.
- Simon JH (1980). "Incidence of periapical cysts in relation to the root canal." J Endod 6(11): 845-8.
- Simon JH, Chimenti RA, Mintz GA (1982). "Clinical significance of the pulse granuloma." J Endod 8(3): 116-9.
- Siqueira JF, Jr, Araujo MC, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ (1997a). "Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals." J Endod 23(8): 499-502.
- Siqueira JF, Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M (1997b). "Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro." Int Endod J 30(4): 279-82.
- Siqueira JF, Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M (1998a). "Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria." J Endod 24(6): 414-6.
- Siqueira JF, Jr, da Silva CH, Cerqueira MdD, Lopes HP, de Uzeda M (1998b). "Effectiveness of four chemical solutions in eliminating *Bacillus subtilis* spores on gutta-percha cones." Endod Dent Traumatol 14(3): 124-6.
- Siqueira JF, Jr, Lopes HP (1999). "Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review." Int Endod J 32(5): 361-9.
- Siqueira JF, Jr, Roças IN, Favieri A, Abad EC, Castro AJ, Gahyva SM (2000). "Bacterial leakage in coronally unsealed root canals obturated with 3 different techniques." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 90(5): 647-50.
- Siqueira JF, Jr. (2001). "Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail." Int Endod J 34(1): 1-10.
- Siqueira JF, Jr, Lopes HP (2001). "Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study." Int Endod J 34(3): 216-20.
- Siqueira JF, Jr, Roças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP (2002). "Actinomyces species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections." J Endod 28(3): 168-72.
- Siqueira JF, Jr, Roças IN (2004). "Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 97(1): 85-94.

- Siqueira JF, Jr., Roças IN, Alves FR, Santos KR (2004). "Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation." J Endod 30(9): 638-43.
- Siqueira JF, Jr., Roças IN (2005a). "Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota." J Endod 31(7): 488-98.
- Siqueira JF, Jr., Roças IN (2005b). "Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections." J Clin Microbiol 43(7): 3314-9.
- Siqueira JF, Jr., Roças IN, Alves FR, Campos LC (2005c). "Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 100(3): 369-74.
- Siqueira JF, Jr., Magalhaes KM, Roças IN (2007). "Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing." J Endod 33(6): 667-72.
- Siqueira JF, Jr. (2008). Microbiology of Apical Periodontitis. In Ørstavik D, Pitt Ford TR editors. Essencial endodontology - prevention and treatment of apical periodontitis. Oxford, Blackwell Munksgaard: 135-196.
- Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN (1997). "Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation." Int Endod J 30(2): 91-5.
- Siren EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Ørstavik D (2004). "In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*." Eur J Oral Sci 112(4): 326-31.
- Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M (2005). "The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy." J Endod 31(9): 669-71.
- Sjögren U, Happonen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G (1988). "Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue." Int Endod J 21(4): 277-82.
- Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G (1991). "The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing." Int Endod J 24(3): 119-25.
- Sjögren U (1996). "Success and failure in endodontics." Umea University Odontological Dissertations, no 60. Umea, Sweden.
- Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997). "Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis." Int Endod J 30(5): 297-306.
- Sobrinho AP, Barros MH, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias LM, Bambirra EA, Bahia MG, Vieira EC (1998). "Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice." J Endod 24(6): 405-8.
- Socransky HD (1997). "Microbiology of periodontal disease." In: Clinical Periodontology and Implant Dentistry (3rd edn). (Lindhe J, Karring T, Lang NP, eds) Copenhagen: Munksgaard, 1997;138-88.
- Sousa CJ, Montes CR, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA (2006). "Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers." J Endod 32(7): 656-62.



- Spangberg LS, Acierno TG, Yongbum Cha B (1989). "Influence of entrapped air on the accuracy of leakage studies using dye penetration methods." J Endod 15(11): 548-51.
- Spangberg LS (1998). "Endodontic Treatment of Teeth Without Apical Periodontitis." In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, editors. Essential Endodontology: Prevention and treatment of apical periodontitis. First edition. Oxford: Blackwell science. 211-214.
- Spangberg LS (2001). "Evidence-based endodontics: the one-visit treatment idea." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 91(6): 617-8.
- Stanley HR, Pereira JC, Spiegel E, Broom C, Schultz M (1983). "The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age." J Oral Pathol 12(4): 257-89.
- Stashenko P (1990). "Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions." Endod Dent Traumatol 6(3): 89-96.
- Stashenko P (1998). Etiology and pathogenesis of pulpitis and apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, editors. Essential Endodontology - prevention and treatment of apical periodontitis. Blackwell Science Ltd. First edition. Oxford. 42-55.
- Steinbrunner RL, Brown CE, Jr., Legan JJ, Kafrawy AH (1998). "Biocompatibility of two apatite cements." J Endod 24(5): 335-42.
- Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Selbst AG, Levy BM (1981). "Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma." J Endod 7(3): 117-22.
- Stratton RK, Apicella MJ, Mines P (2006). "A fluid filtration comparison of gutta-percha versus Resilon, a new soft resin endodontic obturation system." J Endod 32(7): 642-5.
- Strindberg LZ (1956). The dependence of the results of pulp therapy on certain factors : an analytic study based on radiographic and clinical follow-up examinations. PhD Thesis. Stockholm.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006). "Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment." J Endod 32(2): 93-8.
- Sukawat C, Srisuwan T (2002). "A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with Enterococcus faecalis." J Endod 28(2): 102-4.
- Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L (2002). "Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy." J Endod 28(4): 304-10.
- Sunde PT, Olsen I, Gobel UB, Theegarten D, Winter S, Debelian GJ, Tronstad L, Møter A (2003). "Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth." Microbiology 149(Pt 5): 1095-102.
- Sundqvist G (1976). "Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. Umea University Odontological Dissertations no7. Umea, Sweden."
- Sundqvist G (1990). Endodontic microbiology. Experimental Endodontics. LSW S. Boca Raton, FL, CRC Press: 131-53.
- Sundqvist G (1992a). "Ecology of the root canal flora." J Endod 18(9): 427-30.
- Sundqvist G (1992b). "Associations between microbial species in dental root canal infections." Oral Microbiol Immunol 7(5): 257-62.

- Sundqvist G (1993). "Pathogenicity and virulence of black-pigmented gram-negative anaerobes." FEMS Immunol Med Microbiol 6(2-3): 125-37.
- Sundqvist G, Figdor, D. (1998). "Endodontic treatment of apical periodontitis." In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, editors. Essential Endodontology. Prevention and treatment of apical periodontitis. Blackwell science. First edition. Oxford.
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U (1998). "Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 85(1): 86-93.
- Sundqvist G, Figdor D (2003). "Life as an endodontic pathogen: Ecological differences between the untreated and root-filled root canals." Endodontic topics 6: 3-28.
- Susini G, About I, Tran-Hung L, Camps J (2006). "Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model." Int Endod J 39(12): 940-4.
- Swanson K, Madison S (1987). "An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth. Part I. Time periods." J Endod 13(2): 56-9.
- Tagger M, Tagger E (1989). "Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26 in monkeys." Endod Dent Traumatol 5(3): 139-46.
- Tagger M, Tagger E, Tjan AH, Bakland LK (2002). "Measurement of adhesion of endodontic sealers to dentin." J Endod 28(5): 351-4.
- Tanomaru Filho M, Leonardo MR, da Silva LA (2002). "Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion." J Endod 28(4): 295-9.
- Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA (2003). "Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS." Int Endod J 36(11): 733-9.
- Tay FR, Loushine RJ, Monticelli F, Weller RN, Breschi L, Ferrari M, Pashley DH (2005a). "Effectiveness of resin-coated gutta-percha cones and a dual-cured, hydrophilic methacrylate resin-based sealer in obturating root canals." J Endod 31(9): 659-64.
- Tay FR, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF, Pashley DH, Mak YF, Lai CN, Raina R, Williams MC (2005b). "Ultrastructural evaluation of the apical seal in roots filled with a polycaprolactone-based root canal filling material." J Endod 31(7): 514-9.
- Tay FR, Pashley DH, Williams MC, Raina R, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF, King NM (2005c). "Susceptibility of a polycaprolactone-based root canal filling material to degradation. I. Alkaline hydrolysis." J Endod 31(8): 593-8.
- Tay FR, Pashley DH, Yiu CK, Yau JY, Yiu-fai M, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF, King NM (2005d). "Susceptibility of a polycaprolactone-based root canal filling material to degradation. II. Gravimetric evaluation of enzymatic hydrolysis." J Endod 31(10): 737-41.
- Tay FR, Hiraishi N, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Gillespie WT, Doyle MD (2006). "Bondability of Resilon to a methacrylate-based root canal sealer." J Endod 32(2): 133-7.
- Tay FR, Pashley DH (2007). "Monoblocks in root canals: a hypothetical or a tangible goal." J Endod 33(4): 391-8.
- Teixeira FB, Teixeira EC, Thompson J, Leinfelder KF, Trope M (2004). "Dentinal bonding reaches the root canal system." J Esthet Restor Dent 16(6): 348-54; discussion 354.

- Teixeira FB, Teixeira EC, Thompson JY, Trope M (2004). "Fracture resistance of roots endodontically treated with a new resin filling material." J Am Dent Assoc 135(5): 646-52.
- Ten Cate AR (1985). Oral histology: development, structure, and function. 2.<sup>a</sup> edição. St Louis, Mosby Inc.
- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N (2003). "Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century." Cell Mol Life Sci 60(12): 2622-36.
- Theilade E (2003). The microbiology of the necrotic pulp. Textbook of endodontology. G Bergenholtz H-BP, Reit C. Oxford -UK, Blackwell Publishing Ltd: 111-129.
- Torabinejad M, Kiger RD (1985). "A histologic evaluation of dental pulp tissue of a patient with periodontal disease." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 59(2): 198-200.
- Torabinejad M, Ung B, Kettering JD (1990). "In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth." J Endod 16(12): 566-9.
- Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK (2002). "Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 94(6): 658-66.
- Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, Kim J, Shabahang S (2003). "A new solution for the removal of the smear layer." J Endod 29(3): 170-5.
- Toriya Y, Hashiguchi I, Maeda K (1997). "Immunohistochemical examination of the distribution of macrophages and CGRP-immunoreactive nerve fibers in induced rat periapical lesions." Endod Dent Traumatol 13(1): 6-12.
- Tronstad L (1978). "Tissue reactions following apical plugging of the root canal with dentin chips in monkey teeth subjected to pulpectomy." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 45(2): 297-304.
- Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J (1987). "Extraradicular endodontic infections." Endod Dent Traumatol 3(2): 86-90.
- Tronstad L, Barnett F, Cervone F (1990). "Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment." Endod Dent Traumatol 6(2): 73-7.
- Tronstad L, Asbjornsen K, Doving L, Pedersen I, Eriksen HM (2000). "Influence of coronal restorations on the periapical health of endodontically treated teeth." Endod Dent Traumatol 16(5): 218-21.
- Trope M, Chow E, Nissan R (1995). "In vitro endotoxin penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth." Endod Dent Traumatol 11(2): 90-4.
- Trope M, Delano EO, Ørstavik D (1999). "Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment." J Endod 25(5): 345-50.
- Tunga U, Bodrumlu E (2006). "Assessment of the sealing ability of a new root canal obturation material." J Endod 32(9): 876-8.
- Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF (1993). "Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro." Endod Dent Traumatol 9(6): 243-8.
- van der Sluis LW, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR (2006). "The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation." Int Endod J 39(6): 472-6.

- Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B (2007). "Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives." Biomaterials 28(26): 3757-85.
- Van Noort R (1994). "Introduction to dental materials." London.Mosby: 149-154.
- Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD (2006). "A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants." Int Endod J 39(6): 464-71.
- Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ (2004). "In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 97(1): 79-84.
- Waltimo TM, Siren EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP (1997). "Fungi in therapy-resistant apical periodontitis." Int Endod J 30(2): 96-101.
- Waltimo TM, Siren EK, Ørstavik D, Haapasalo MP (1999). "Susceptibility of oral Candida species to calcium hydroxide in vitro." Int Endod J 32(2): 94-8.
- Waltimo TM, Ørstavik D, Siren EK, Haapasalo MP (2000). "In vitro yeast infection of human dentin." J Endod 26(4): 207-9.
- Waltimo TM, Boiesen J, Eriksen HM, Ørstavik D (2001). "Clinical performance of 3 endodontic sealers." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 92(1): 89-92.
- Walton RT, M. (1997). "Endodoncia - Princípios e prática. 2ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana."
- Wang JD, Hume WR (1988). "Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentine." Int Endod J 21(1): 17-26.
- Weiger R, Rosendahl R, Löst C (2000). "Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions." Int Endod J 33(3): 219-26.
- Wesselink PR (2003). Root filling techniques. In Bergenholtz G, Horsted-Bindslev P, Reit C editors. Textbook of Endodontology. First edition. Oxford, Blackwell Munksgaard: 286-299.
- Williams C, Loushine RJ, Weller RN, Pashley DH, Tay FR (2006). "A comparison of cohesive strength and stiffness of Resilon and gutta-percha." J Endod 32(6): 553-5.
- Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, Bolger A, Cabell CH, Takahashi M, Baltimore RS, Newburger JW, Strom BL, Tani LY, Gerber M, Bonow RO, Pallasch T, Shulman ST, Rowley AH, Burns JC, Ferrieri P, Gardner T, Goff D, Durack DT (2007). "Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group." J Am Dent Assoc 138(6): 739-45, 747-60.
- Wu MK (1993a). In vitro determination of leakage in endodontic research. Endodontology. Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam. PhD Thesis. Amsterdam.
- Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR, Moorer WR (1993b). "Fluid transport and bacterial penetration along root canal fillings." Int Endod J 26(4): 203-8.

- Wu MK, Wesselink PR (1993c). "Endodontic leakage studies reconsidered. Part I. Methodology, application and relevance." Int Endod J 26(1): 37-43.
- Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR (1994). "Leakage of four root canal sealers at different thickness." Int Endod J 27(6): 304-8.
- Wu MK, Van Der Sluis LW, Wesselink PR (2004). "Fluid transport along gutta-percha backfills with and without sealer." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 97(2): 257-62.
- Wu MK, van der Sluis LW, Wesselink PR (2006). "A 1-year follow-up study on leakage of single-cone fillings with RoekoRSA sealer." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 101(5): 662-7.
- Xu Q, Fan MW, Fan B, Cheung GS, Hu HL (2005). "A new quantitative method using glucose for analysis of endodontic leakage." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 99(1): 107-11.
- Yesilsoy C, Koren LZ, Morse DR, Kobayashi C (1988). "A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 65(4): 459-67.
- Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I (1995). "Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant." J Endod 21(12): 592-3.
- Yoshii E (1997). "Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity." J Biomed Mater Res 37(4): 517-24.
- Yoshikawa T, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Pashley DH (1999). "Effects of dentin depth and cavity configuration on bond strength." J Dent Res 78(4): 898-905.
- Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T (2005). "Chelation in root canal therapy reconsidered." J Endod 31(11): 817-20.
- Zehnder M (2006). "Root canal irrigants." J Endod 32(5): 389-98.
- Zerella JA, Fouad AF, Spangberg LS (2005). "Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 100(6): 756-61.
- Zoletti GO, Siqueira JF, Jr., Santos KR (2006). "Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches." J Endod 32(8): 722-6.



## VI – Anexos

### Anexo 1 – Lista de materiais utilizados nos protocolos experimentais

Material	Fabricante	Lote	Validade
Absorvent Paper Points	Dentsply	011002	10/2007
EDTA - Root Canal Enlarger	PD – Produits Dentaires SA	4845KG	09/2006
Endo-Eze® Tips 18G	Ultradent Products	B01QP	–
Glyde™ File Prep	Maillefer-Dentsply	030510	05/2005
GuttaFlow®	Coltène/Whaledent	8366281	08/2005
Guta-percha	Dentsply	021102	11/2006
Photac™ Fil Quick Aplicap	3M ESPE	162523	07/2005
Primer Epiphany™	Pentron clinical technologies	92464	12/2005
Pulp Canal Sealer® EWT	Kerr SybronEndo	3-2065	03/2005
Resilon™ points	Pentron clinical technologies	88480, 88481, 88482, 88483, 90344, 90345, 91751, 93944	12/2007
Roeko non-latex dental dam	Coltène/Whaledent	03323	11/2008
Root Canal Sealant Epiphany™	Pentron clinical technologies	95704	01/2006
Solução de iodopovidona a 10%	Iodolab-Labesfal	R34516	02/2006
Zircon Prophylactic Paste	PD – Produits Dentaires SA	5003	02/2009



## Anexo 2 – Lista de produtos referenciados na tese e respectivos endereços na internet

<b>Produto</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Endereço na Internet</b>
AH 26	Maillefer	<a href="http://www.maillefer.com">http://www.maillefer.com</a>
All-Bond 2®	Bisco	<a href="http://www.bisco.com">http://www.bisco.com</a>
Apatite Root Sealer	Dentsply	<a href="http://www.dentsply-sankin.com">http://www.dentsply-sankin.com</a>
Apexit	Ivoclar	<a href="http://www.ivoclarvivadent.com">http://www.ivoclarvivadent.com</a>
Digluconato de clorhexidina	Sigma	<a href="http://sigmaaldrich.com">http://sigmaaldrich.com</a>
Endo acess	Maillefer/Dentsply	<a href="http://www.maillefer.com">http://www.maillefer.com</a>
Endo-Eze tips 18G	Ultradent	<a href="http://www.ultradent.com">http://www.ultradent.com</a>
EndoREZ	Ultradent	<a href="http://www.ultradent.com">http://www.ultradent.com</a>
Epiphany	Pentron Clinical Technologies	<a href="http://www.pentron.com">http://www.pentron.com</a>
Glyde™ File Prep	Maillefer/Dentsply	<a href="http://www.maillefer.com">http://www.maillefer.com</a>
GuttaFlow®	Coltène/Whaledent	<a href="http://guttaflow.com">http://guttaflow.com</a>
HERO 642®	MicroMega	<a href="http://micro-mega.com">http://micro-mega.com</a>
KetacEndo™ Aplicap	3M	<a href="http://3M.com">http://3M.com</a>
Limas K	VDW	<a href="http://www.vdw-dental.com">http://www.vdw-dental.com</a>
Metilcelulose Viscosidade 4,000 USP	Sigma	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a>
OpalDam	Ultradent	<a href="http://www.ultradent.com">http://www.ultradent.com</a>
Optilux 501	Demetron/Kerr corporation	<a href="http://www.Kerrdental.com">http://www.Kerrdental.com</a>
Photac™ Fil Quick Aplicap	3M	<a href="http://3M.com">http://3M.com</a>
Pulp Canal Sealer™ EWT	Sybronendo	<a href="http://www.sybronendo.com">http://www.sybronendo.com</a>

<b>Produto</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Endereço na Internet</b>
Resilon	Pentron Clinical	<a href="http://pentron.com">http://pentron.com</a>
Roeko non-latex dental dam	Colténe/Whaledent	<a href="http://www.coltenewhaledent.biz">http://www.coltenewhaledent.biz</a>
RoekoSeal	Colténe/Whaledent	<a href="http://www.coltenewhaledent.biz">http://www.coltenewhaledent.biz</a>
Root canal enlarger EDTA	PD- Produits Dentaires SA	<a href="http://pdsa.ch">http://pdsa.ch</a>
Sealapex™	Sybronendo	<a href="http://www.sybronendo.com">http://www.sybronendo.com</a>
Solução de iodopovidona a 10%	Iodolab-Labesfal	<a href="http://www.infarmed.pt">http://www.infarmed.pt</a>
System B™	Sybronendo	<a href="http://www.sybronendo.com">http://www.sybronendo.com</a>
Zircon Prophylactic Paste	PD-Produits Dentaires SA	<a href="http://www.produits-dentaires.ch">http://www.produits-dentaires.ch</a>
Zoletil 50®	Virbac	<a href="http://www.virbac.cz">http://www.virbac.cz</a>

### Anexo 3 – Produtos e equipamentos para processamento histológico

Produto	Lote	Fabricante
Ácido fórmico a 100%	K34133264	Merk- Alemanha
Cassetes para inclusão	1805	Kartell Spa-Itália
Citrato de sódio	95149	Panreac Espanha
Etanol absoluto	346/05	AGA-Portugal
Formaldeído a 10% neutralizado	94155 LFR	Panreac Espanha
Lamelas glaser Ø22mm	4711285	Menzel-Alemanha
Lâminas de microtomia	04120549P	Feather-Japão
Lâminas de vidro canto fosco 90º	1741375	Menzel-Alemanha
Paraplast regular	-----	Sigma Aldrich-USA
Xylol	852730	Panreac Espanha

### Anexo 4 – Equipamentos para processamento histológico

Equipamento	Nº de série/Referência	Fabricante
Banho Maria	B234624	FALC - Itália
Câmaras de fluxo laminar		Pbinternacional
Dispensador de parafina	901257025/TES99200	Medite - Alemanha
Estufa	Trade Raypa	Reagente 5
Hatt	Super Chemo Work Station	Pbinternacional
Incubadora	Economy Incubator with fan	Gallenkamp
Micrótomo	RM 2155	Leica Portugal
Placa de aquecimento	504398024/OTS403040	Medite - Alemanha
Placa de frio	901257025/TES99410	Medite - Alemanha

### Índice

Agradecimentos	
Sumário .....	1
<b>I – Introdução .....</b>	<b>3</b>
1. Microbiologia da periodontite apical .....	7
1.1. Portas de entrada dos microrganismos.....	7
1.2. Distribuição dos microrganismos.....	9
1.2.1. Canal radicular.....	10
1.2.2. Túbulos dentinários .....	10
1.2.3. Superfície externa do ápice radicular.....	14
1.2.4. Tecido periapical .....	15
1.3. Ecologia da população microbiana em infecções primárias ...	16
1.3.1. Pressões selectivas e dinâmica da infecção primária ....	17
1.3.2. Sinergismo e antagonismo microbiano .....	20
1.3.3. Factores de virulência .....	20
2. Métodos de controlo e erradicação da infecção canalар .....	22
2.1. Resposta do hospedeiro .....	23
2.1.1. Resposta dos tecidos periapicais .....	23
2.1.2. Resposta celular.....	26
2.1.3. Resposta humoral.....	27
2.2. Antibioterapia sistémica.....	28

2.3. Preparação biomecânica .....	29
2.3.1. Instrumentação .....	29
2.3.2. Irrigação .....	30
2.4. Medicação intracanal .....	36
2.4.1. Hidróxido de cálcio .....	39
2.4.2. Clorohexidina (CHX) .....	41
2.4.3. Interação entre o hidróxido de cálcio e clorohexidina...	43
2.5. Obturação Canalar .....	44
2.5.1. Evolução histórica dos materiais .....	44
2.5.2. Materiais de núcleo.....	46
2.5.2.1. Guta-percha.....	46
2.5.2.2. Cones de prata .....	48
2.5.2.3. Cones de gutta-percha revestidos de resina.....	48
2.5.2.4. Polímero de policaprolactona - Resilon™ .....	49
2.5.3. Cimentos endodônticos .....	50
2.5.3.1. Óxido de zinco-eugenol .....	51
2.5.3.2. Resinas polivinílicas.....	53
2.5.3.3. Resinas epóxicas .....	53
2.5.3.4. Hidróxido de cálcio.....	54
2.5.3.5. Ionómeros de vidro .....	55
2.5.3.6. Silicones.....	56
2.5.3.7. Trifosfato de cálcio .....	57
2.5.3.8. Resinas de metacrilato – Endorez™, Epiphany™ ...	58
2.6. Restauração coronária .....	62
3. Periodontite apical pós-tratamento endodôntico.....	63
3.1. Etiologia .....	65
3.1.1. Causas não-microbianas.....	66
3.1.2. Causas microbianas.....	67
3.1.2.1. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	69
3.1.2.2. <i>Candida albicans</i> .....	72
3.2. Microinfiltração coronária .....	73
<b>II – Trabalho Experimental.....</b>	<b>77</b>
A) Estudo experimental <i>in vitro</i> .....	81
1. Objectivos.....	82

2. Material e Métodos .....	83
2.1. Selecção e preparação dos dentes.....	83
2.2. Preparação do gel de clorhexidina a 2% .....	84
2.3. Definição dos grupos controlo e teste .....	84
2.4. Montagem do modelo experimental.....	86
2.5. Cultura dos microrganismos .....	86
2.6. Preparação das amostras para inoculação .....	87
2.7. Inoculação.....	88
2.8. Métodos estatísticos.....	90
3. Resultados .....	91
4. Discussão .....	96
 B) Estudo experimental <i>in vivo</i> .....	 105
1. Objectivos.....	106
2. Materiais e métodos .....	107
2.1. Amostra .....	107
2.2. Manutenção dos animais.....	107
2.3. Anestesia e sedação.....	108
2.4. Definição dos grupos controlo positivo, negativo e experimental	108
2.5. Aleatorização .....	110
2.6. Protocolo operativo .....	110
2.7. Recuperação da anestesia e sedação .....	119
2.8. Avaliação clínica e radiográfica da cavidade oral .....	119
2.9. Eutanásia dos animais .....	120
2.10. Colheita de amostras para histologia .....	120
2.11. Preparação histológica .....	121
2.12. Histomorfometria .....	124
2.13. Métodos estatísticos .....	125
3. Resultados .....	126
3.1. Avaliação Clínica.....	126
3.2. Avaliação radiológica .....	127
3.3. Observação histopatológica .....	129
3.3.1. Grupo controlo positivo .....	132
3.3.2. Grupo controlo negativo .....	135
3.3.3. Grupo teste .....	141

3.3.4. Intensidade da reacção inflamatória periapical .....	150
3.3.5. Encerramento dos <i>foramina</i> apicais, reabsorção dos tecidos duros e presença de células fagocitárias.....	151
3.4. Histomorfometria.....	153
3.4.1 Espessura do ligamento periodontal .....	153
3.4.2. Área de cimento secundário .....	153
3.5. Amostras com extravasamento apical de material de obturação	154
4. Discussão .....	161
C) Conclusões .....	179
<b>III – Resumo</b> .....	183
<b>IV – Abstract</b> .....	191
<b>V – Bibliografia</b> .....	209
<b>VI – Anexos</b> .....	237
<b>VII – Índice</b> .....	241



## VIII – Table of contents

---

### Table of contents

Aknowledgments	
Summary .....	1
<b>I – Introduction</b> .....	3
1. Microbiology of apical periodontitis .....	7
1.1. Pathways of entry for microorganisms into the root canal system.....	7
1.2. Location of microorganisms in endodontic infections .....	9
1.2.1. Root canal .....	10
1.2.2. Dentinal tubules .....	10
1.2.3. External surface of the root apex.....	14
1.2.4. Periapical tissue .....	15
1.3. Ecology of the microbial flora in primary apical periodontitis	16
1.3.1. Selective pressures and infection dynamics.....	17
1.3.2. Microbial synergism and antagonism.....	20
1.3.3. Virulence factors .....	20
2. Methods for control of intraradicular infection.....	22
2.1. Host response .....	23
2.1.1. Response of the periapical tissues .....	23
2.1.2. Cellular response.....	26
2.1.3. Humoral response .....	27
2.2. Systemic antibiotic therapy .....	28

2.3. Biomechanical preparation .....	29
2.3.1. Instrumentation .....	29
2.3.2. Irrigation .....	30
2.4. Intracanal medication.....	36
2.4.1. Calcium hydroxide.....	39
2.4.2. Chlorhexidine .....	41
2.4.3. Interaction between calcium hydroxide and chlorhexidine .....	43
2.5. Root canal filling .....	44
2.5.1. Historical perspective.....	44
2.5.2. Core materials .....	46
2.5.2.1. Gutta-percha.....	46
2.5.2.2. Silver points.....	48
2.5.2.3. Coated gutta-percha points .....	48
2.5.2.4. Polycaprolactone polymer – Resilon™ .....	49
2.5.3. Root canal sealers .....	50
2.5.3.1. Zinc-oxide eugenol.....	51
2.5.3.2. Polivinylic resins .....	53
2.5.3.3. Epoxy resins .....	53
2.5.3.4. Calcium hydroxide .....	54
2.5.3.5. Glass-ionomer cements .....	55
2.5.3.6. Silicones.....	56
2.5.3.7. Calcium tri-phosphate .....	57
2.5.3.8. Metacrylate resins – EndoRez™, Epiphany™ .....	58
2.6. Coronal restoration .....	62
3. Post-treatment apical periodontitis .....	63
3.1. Etiology .....	65
3.1.1. Non-microbial causes.....	66
3.1.2. Microbial causes.....	67
3.1.2.1. Enterococcus faecalis .....	69
3.1.2.1. Candida albicans.....	72
3.2. Coronal microleakage.....	73
<b>II – Experimental research .....</b>	<b>77</b>
A) <i>In vitro</i> coronal microleakage study .....	81
1. Objectives.....	82

2. Material and methods .....	83
2.1. Selection and preparation of tooth specimens .....	83
2.2. Preparation of 2% chlorhexidine gel .....	84
2.3. Groups – test, positive control and negative control.....	84
2.4. Experimental model set-up .....	86
2.5. Culture of microorganisms .....	86
2.6. Preparation of samples for inoculation .....	87
2.7. Inoculation .....	88
2.8. Statistical methods .....	90
3. Results .....	91
4. Discussion.....	96
 B) <i>In vivo</i> coronal microleakage study .....	105
1. Objectives.....	106
2. Material and methods .....	107
2.1. Sample .....	107
2.2. Management of the animals .....	107
2.3. Sedation and anaesthesia .....	108
2.4. Groups – test, positive control and negative control.....	108
2.5. Randomization .....	110
2.6. Treatment protocol .....	110
2.7. Recovery from sedation and anesthesia .....	119
2.8. Clinical and radiological evaluation of the oral cavity.....	119
2.9. Euthanasia of the animals .....	120
2.10. Collection of samples for histology.....	120
2.11. Histological preparation .....	121
2.12. Histomorphometry .....	124
2.13. Statistical methods .....	125
3 Results .....	126
3.1. Clinical observations .....	126
3.2. Radiological observations.....	127
3.3. Histopathology .....	129
3.3.1. Positive control group .....	132
3.3.2. Negative control groups .....	135
3.3.3. Test groups .....	141
3.3.4. Intensity of the periapical inflammatory reaction .....	150

3.3.5. Closure of apical foramina, hard tissues resorption and presence of fagocytic cells.....	151
3.4. Histomorphometry .....	153
3.4.1. Apical periodontal ligament thickness.....	153
3.4.2. Area of secondary cementum.....	153
3.5. Samples with sealer extrusion into periapical tissues .....	154
4. Discussion.....	161
C) Conclusions .....	179
<b>III – Abstract .....</b>	<b>183</b>
<b>IV – Abstract in english .....</b>	<b>191</b>
<b>V – Bibliography .....</b>	<b>209</b>
<b>VI – Appendix.....</b>	<b>237</b>
<b>VII – Table of contents .....</b>	<b>241</b>